

Entschwefelungsversuche mit Lignin-Thioglykolsäuren (Ligninuntersuchungen XXI)¹

Von BROR HOLMBERG

1. Einleitung und Übersicht

Im Zusammenhang mit Versuchen über die Einwirkung der Thioglykolsäure auf das Fichtenholz wurden mehr im Vorbeigehen auch einige Versuche über Umsetzungen der dabei entstehenden Lignin-Thioglykolsäuren (Li-Th) mit Reagenzen angestellt, welche gemäss angestellter Versuche mit Modellsstanzen möglicherweise entschwefelnd einwirken können, wie mit Alkalien, Salzsäure, Quecksilberchlorid, Dimethylsulfat, Monobromessigsäure, Jod und Formaldehyd (2 und 3). Diese Versuche sind dann in verschiedenen Richtungen ergänzt worden, worüber im Folgenden näher berichtet wird.

Eine schwach entschwefelnde Wirkung auf Lignin-Thioglykolsäuren übt schon verdünnte Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur aus, was als auf Verseifung von noch vorhandenen Estergruppen beruhend angesehen wurde (2, S. 7 und S. 16 ff.). Bedeutend weiter verlief die Abspaltung der Thioglykolsäure durch das Alkali, wenn bei höherer Temperatur gearbeitet wurde, aber aus den Elementaranalysen geht hervor, dass das Alkali hierbei nicht nur verseifend wirkt, sondern dass auch eine Abspaltung der Thioglykolsäure ohne Ersatz eintreten kann. So wurde z. B. aus einer Li-Th B² mit dem Baustück $C_9H_{9.61}O_{3.93}$ und dem Schwefelgehalt $S/C_9 = 1.03$ bei der Erhitzung auf dem Wasserbade 4 Stunden mit 2-n. Natronlauge ein Produkt gebildet, welches das Baustück $C_9H_{8.85}O_{3.27}$ und $S/C_9 = 0.67$ zeigte; nach einer Wiederholung der Behandlung wurde als Formel für das Baustück der entstandenen Li-Th der Ausdruck $C_9H_{8.74}O_{3.29}$ und $S/C_9 = 0.57$ gefunden (2, S. 12).

Bei einer Fortsetzung der Verseifungsversuche (4) ergab eine Li-Th B mit dem Baustück $C_9H_{10.76}O_{4.11}$ und $S/C_9 = 1.09$ mit 0,5-n. *Natronlauge* bei gewöhnlicher Temperatur ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{10.18}O_{3.81}$ und $S/C_9 = 1.03$. Nach Erhitzung desselben Ausgangsmateriales mit 2-n. Natronlauge lieferte es ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{9.18}O_{3.40}$ und $S/C_9 = 0.72$, und nach noch einer Behandlung in der gleichen Weise zeigte es das Baustück $C_9H_{8.87}O_{3.24}$ und $S/C_9 = 0.61$. — Als eine Li-Th C mit dem Baustück $C_9H_{10.08}O_{3.91}$ und $S/C_9 = 0.97$ mit Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur behandelt wurde, lieferte sie ein Produkt mit dem Bau-

¹ Ligninuntersuchungen XX: Fichtenlignine und Thioglykolsäure, siehe (1).

² Als A-Präparate werden Produkte bezeichnet, welche bei Erhitzungen von je 10 g Holzmehl, 5 g Thioglykolsäure und 50 ml 2-n. Salzsäure (Verfahren A) gebildet werden, während bei Verwendung von 50 g Thioglykolsäure und nur 5 ml der Salzsäure in der Hitze (Verfahren B) B-Präparate, und in der gleichen Weise, aber bei gewöhnlicher Temperatur (Verfahren C), C-Präparate entstehen.

stück $C_9H_{9.96}O_{3.85}$ und $S/C_9 = 0,93$, wonach in der Wärme ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{9.20}O_{3.57}$ und $S/C_9 = 0,62$ entstand. Nach noch einer Behandlung in der gleichen Weise zeigte das neue Produkt das Baustück $C_9H_{8.82}O_{3.34}$ und $S/C_9 = 0,51$.

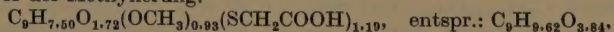
Auch von *Ammoniak* werden die Lignin-Thioglykolsäuren merkbar entschwefelt (4), aber ausser Verseifung kann dabei auch eine Amidierung eintreten. So ergab eine Reaktionsmasse A mit konz. Ammoniak ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{9.44}O_{3.88}$, $N/C_9 = 0,29$ und $S/C_9 = 0,80$, während aus einer anderen Reaktionsmasse A mit Natronlauge eine Li-Th A mit dem Baustück $C_9H_{9.73}O_{3.78}$ und $S/C_9 = 0,77$ erhalten wurde; aus dieser Säure entstand mit Ammoniak ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{9.69}O_{3.81}$, $N/C_9 = 0,06$ und $S/C_9 = 0,75$. — Aus einer Reaktionsmasse B wurde wie oben mit Ammoniak ein Produkt erhalten, welches das Baustück $C_9H_{9.86}O_{4.12}$, $N/C_9 = 0,23$ und $S/C_9 = 1,13$ zeigte, während mit Natronlauge aus einer anderen Reaktionsmasse B eine Li-Th B herausgelöst wurde, welche das Baustück $C_9H_{10.01}O_{3.93}$ und $S/C_9 = 1,06$ zeigte, und aus dieser Säure mit Ammoniak ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{10.54}O_{3.90}$, $N/C_9 = 0,07$ und $S/C_9 = 1,07$ erhalten wurde. Durch die Einwirkung des Alkalis bei der Herauslösung der Lignin-Thioglykolsäuren aus den Reaktionsmassen wird also der grösste Teil der mit Ammoniak reagierenden Thioglykolsäurereste entfernt, und da ein Ammoniakprodukt beim Destillieren mit Natronlauge quantitativ Ammoniak abspaltete, dürften diese Produkte als Amide und die Bindungen der verseifbaren bzw. amidierbaren Gruppen als thioglykolidartig aufzufassen sein.

Auch von *Salzsäure* werden die Lignin-Thioglykolsäuren bei Erhitzung angegriffen, wobei wie bei den entsprechenden Behandlungen mit Natronlauge Abspaltung von Thioglykolsäure ohne Ersatz eintreten kann. So lieferte z. B. die Li-Th B oben mit dem Baustück $C_9H_{9.61}O_{3.93}$ und $S/C_9 = 1,03$ beim 4stündigen Kochen mit salzsäurehaltiger Essigsäure ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{8.73}O_{3.24}$ und $S/C_9 = 0,60$ (2, S. 11).

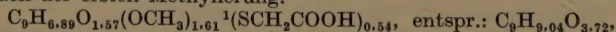
Versuche, Lignin-Thioglykolsäuren mit Hilfe von *Quecksilberchlorid* zu entschwefeln, sind allerdings teilweise gelungen, aber da dabei ausser Chlorquecksilberthioglykolsäure auch Kalomel entsteht und somit (wie u. a. bei ähnlicher Behandlung der Vanillinmercaptalessigsäure [5]) die Ligninkomponente oxydativ angegriffen wird, wurden diese Versuche nicht fortgesetzt (3). — Versuche eine Lignin-Thioglykolsäure C mit dem Baustück $C_9H_{10.07}O_{3.95}$ und $S/C_9 = 0,89$ durch Oxydation mit *Kaliumpersulfat* zu entschwefeln, waren zwar auch nicht ganz erfolglos, indem z. B. bei einem solchen Versuch ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{8.93}O_{4.09}$ und $S/C_9 = 0,74$ erhalten wurde, aber aus der Formel für das Baustück geht hervor, dass auch hier die Ligninkomponente selbst merkbar oxydiert wurde.

Das die Lignin-Thioglykolsäuren bei Methylierungen mit *Dimethylsulfat* schwefelärmer werden, wurde schon vor langem beobachtet (6), und als dann (3) eine Probe einer Li-Th B wiederholt solchen Behandlungen unterzogen wurde, erhielten die Produkte die folgenden Zusammensetzungen:

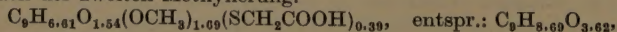
Vor der Methylierung:



nach der ersten Methylierung:



nach der zweiten Methylierung:

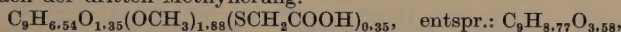


¹ Einschliesslich ev. vorkommenden Sulfoniummethylyls.

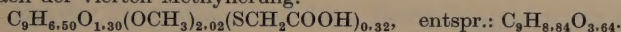
Tabelle 1.

<i>T</i>	Baustück	CH_3/C_9	S/C_9
<i>Material Li-Th A</i>			
0	$\text{C}_9\text{H}_{9.48}\text{O}_{3.80}$	0,92	0,79
7	$\text{C}_9\text{H}_{8.93}\text{O}_{3.44}$	1,07	0,26
14	$\text{C}_9\text{H}_{8.84}\text{O}_{3.23}$	1,06	0,14
28	$\text{C}_9\text{H}_{9.00}\text{O}_{3.75}$	1,14	0,11
56	$\text{C}_9\text{H}_{9.33}\text{O}_{3.76}$	1,18	0,12
140	$\text{C}_9\text{H}_{9.03}\text{O}_{3.40}$	1,15	0,08
<i>Material Li-Th B</i>			
0	$\text{C}_9\text{H}_{9.36}\text{O}_{3.60}$	0,88	0,97
10	$\text{C}_9\text{H}_{9.10}\text{O}_{3.69}$	1,16	0,40
40 + 60	$\text{C}_9\text{H}_{8.46}\text{O}_{2.99}$	1,07	0,18
<i>Material Li-Th C</i>			
0	$\text{C}_9\text{H}_{9.85}\text{O}_{4.07}$	0,91	0,88
14	$\text{C}_9\text{H}_{9.61}\text{O}_{3.43}$	1,10	0,18
70	$\text{C}_9\text{H}_{9.08}\text{O}_{3.58}$	1,12	0,10
126	$\text{C}_9\text{H}_{9.01}\text{O}_{3.51}$	1,13	0,07

nach der dritten Methylierung:



nach der vierten Methylierung:



Aus der Zusammensetzung des Schlussproduktes geht hervor, dass eine weitgehende Abspaltung von (methylierter) Thioglykolsäure eingetreten ist, und dass hierbei, wie bei der Methylierung der α -Phenäthylthioglykolsäure (6), sowohl Ersatz des Schwefels durch Hydroxyl als auch Abspaltung unter Entstehung einer Doppelbindung vorgekommen ist. Inwieweit die beträchtliche Zunahme des Methoxylgehaltes auf einer Methylierung dieses Hydroxyls oder anderer methylierbarer Gruppen beruht, muss offen gelassen werden.

Da die oben referierten Methylierungen in alkalischem Medium vor sich gegangen sind, wurden in einigen neuen Serien (4) die Lignin-Thioglykolsäuren mit *Methyljodid* in Essigsäureäthylester umgesetzt und dann die entstandenen Sulfoniumjodide mit Natronlauge behandelt. Die Zusammensetzungen der dabei nach *T*-tägigen Einwirkungen des Methyljodids erhaltenen, jodfreien Produkte gehen aus Tabelle 1 hervor.

Bei dieser Arbeitsweise sind die Entschwefelungen noch weiter als bei den Versuchen mit dem Dimethylsulfat vor sich gegangen, die Alkoholbildung überwiegt die Äthylbildung und die Zunahmen der Methoxylwerte sind nur gering. — Als das bei dem letzten Versuche mit der Li-Th B erhaltene Produkt gemäss dem B-Verfahren mit Thioglykolsäure umgesetzt wurde, resultierte eine neue Li-Th B mit dem Baustück $\text{C}_9\text{H}_{8.52}\text{O}_{3.31}$, $\text{CH}_3/\text{C}_9 = 0,95$ und $\text{S}/\text{C}_9 = 0,74$, was ja auf einen beträchtlichen Ersatz eines Hydroxyls durch den Mercaptoest hindeutet.

Bei einem Thetinisierungsversuch mit der Li-Th B mit dem Baustück $\text{C}_9\text{H}_{9.62}\text{O}_{3.84}$ und $\text{S}/\text{C}_9 = 1,19$ wurde diese Säure zusammen mit *Monobromessigsäure* in Natronlauge gelöst und die allmählich sauer gewordene Lösung dann und wann mit derselben Lauge neutralisiert, bis sie sich nach einem Monat bei gewöhnlicher Temperatur

nicht mehr veränderte. Das dann beim Ansäuern erhaltene Produkt enthielt das Baustück $C_9H_{8,83}O_{3,84}$ und $S/C_9 = 0,17$ (3). — Bei später in der Wärme ausgeführten Versuchen (4) ergab eine Li-Th B mit dem Baustück $C_9H_{9,63}O_{3,86}$ und $S/C_9 = 1,00$ mit *Monochloressigsäure* und Natronlauge ein Schlussprodukt mit dem Baustück $C_9H_{9,31}O_{3,42}$ und $S/C_9 = 0,46$, während aus einer Lösung von einer Li-Th B mit dem Baustück $C_9H_{9,63}O_{3,84}$ und $S/C_9 = 0,99$, Monochloressigsäure und Soda in Überschuss ein Endprodukt mit dem Baustück $C_9H_{9,17}O_{3,56}$ und $S/C_9 = 0,46$ erhalten wurde. Bei ähnlichen Versuchen mit *Monobromessigsäure* lieferte eine Li-Th C mit dem Baustück $C_9H_{10,07}O_{3,95}$ und $S/C_9 = 0,89$ mit Natronlauge ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{9,11}O_{3,65}$ und $S/C_9 = 0,35$, während in Sodalösung ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{9,23}O_{3,55}$ und $S/C_9 = 0,35$ entstand. Zum Schluss lieferte die Li-Th B mit dem Baustück $C_9H_{9,63}O_{3,84}$ und $S/C_9 = 0,99$ mit *Monojodessigsäure* und Soda ein Produkt mit dem Baustück $C_9H_{8,94}O_{3,80}$ und $S/C_9 = 0,19$.

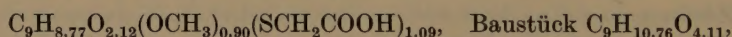
Auch bei diesen Versuchen deuten die Formeln der erhaltenen Produkte an, dass sowohl Alkohole wie Äthylenverbindungen entstanden sind.

Diese und die folgende Untersuchung wurden in der damaligen org.-chemischen Abteilung des Nobelinstitutes der Kgl. Akademie der Wissenschaften, Stockholm, und mit analytischer Beihilfe von Frau MAJBRIIT VESTERGAARD ausgeführt.

2. Verseifungs- und Amidierungsversuche

A. Versuche mit Natronlauge

Von einer Li-Th B der Zusammensetzung



wurden 2,5 g in 50 ml 0,5-n. Natronlauge gelöst, wonach nach 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur die Lösung mit 50 ml Wasser verdünnt und dann mit 15 ml 2-n. Salzsäure versetzt wurde. Dabei entstand eine käsige Fällung, welche allmählich in ein braungelbes Pulver übergang. Nach Waschen mit Wasser und Trocknen auf Tonscherben wog das Produkt 2,5 g, verlor im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 5,77 % an Gewicht und ergab dann bei der Analyse:

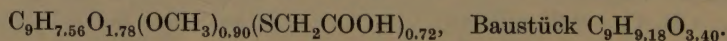
Für $C_9H_{8,26}O_{1,89}(OCH_3)_{0,89}(SCH_2COOH)_{1,03}$ (268,12):

ber.: C 53,53, H 5,27, S 12,32, OCH_3 10,30 %,

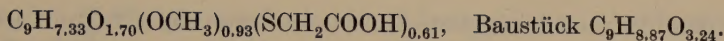
gef.: C 53,45, H 5,27, S 12,35, OCH_3 10,32 %.

Baustück $C_9H_{10,18}O_{3,81}$.

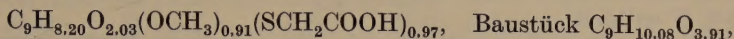
Als andererseits 5 g desselben Ausgangsmateriales mit 50 ml 2-n. Natronlauge gelöst und die Lösung 4 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt worden war, lieferte sie dann wie oben 3,95 g eines griesig harzigen Pulvers, welches 3,73 % Feuchtigkeit enthielt und in trockenem Zustande die folgende Zusammensetzung zeigte:



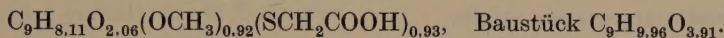
Nach neuer Behandlung von 3,9 g dieses Produktes in der gleichen Weise mit 50 ml 2-n. Natronlauge wurden zum Schluss 3,5 g eines beigefarbenen, 3,75 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers zurückgewonnen, welches in trockener Form die folgende Zusammensetzung zeigte:



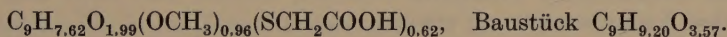
Von einer Li-Th C der Zusammensetzung



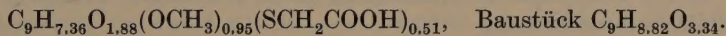
lieferten 6,8 g mit 100 ml 1-n. Natronlauge eine braune Lösung, welche am folgenden Tage mit 200 ml Wasser verdünnt und dann mit 25 ml 5-n. Salzsäure versetzt wurde. Hierbei entstand eine käsige Fällung, welche am folgenden Tage aus einem gut abgesetzten Pulver bestand. Nach 10 Minuten auf dem Wasserbade bestand das Produkt aus einer halbfesten Masse, welche beim Erkalten spröde und harzig wurde, und nach Reiben mit Wasser, Abfiltrierung, Waschen mit Wasser bis zu im Filtrate auftretender Opaleszenz und Trocknen auf Tonscherben aus 6,4 g eines blass korkfarbenen, locker zusammengesinterten, 5,04 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers bestand. Nach dem Trocknen zeigte es die Zusammensetzung



Von diesem Produkte wurden 5 g in 70 ml 1-n. Natronlauge gelöst und die Lösung 4 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, wonach wie oben 4 g eines korkfarbenen, 4,29 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers erhalten wurden. Nach dem Trocknen zeigte es die Zusammensetzung



Bei der Behandlung von 2,5 g dieses Produktes wie vorher mit 35 ml 1-n. Natronlauge wurden 2,2 g cacaofarbenes Pulver zurückgewonnen, welches 3,97 % Feuchtigkeit enthielt und nach dem Trocknen die folgende Zusammensetzung zeigte:



B. Versuche mit Ammoniak

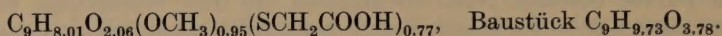
Als eine bei einem A-Versuch aus 10 g Holzmehl usw. erhaltene Reaktionsmasse von 9,7 g Gewicht mit 25 ml konz. Ammoniak ausgerührt wurde, entstand allmählich eine gelatinös teigige Masse, welche nach 2 Tagen bei Raumtemperatur mit 25 ml Wasser versetzt wurde. Das dabei ungelöste Material wurde unter schwachem Unterdruck abfiltriert und mit 100 ml Wasser gewaschen, wonach das erhaltene, dunkelbraune Filtrat durch Evakuieren von dem grössten Teil des Ammoniaks befreit wurde. Beim Zusatz von 25 ml 5-n. Salzsäure lieferte es dann eine käsige Fällung, welche bis zum folgenden Tage in ein voluminöses Pulver überging. Dieses Pulver sinterte auf dem Wasserbade zu einer halbfesten, teigigen Masse zusammen, welche beim Erkalten des Gemisches spröde und harzig wurde und nach Reiben usw. wie oben zum Schluss aus 3,2 g korkfarbenes Pulver bestand. Das Produkt enthielt 7,54 % Feuchtigkeit und ergab in trockener Form bei der Analyse:

Für $C_9H_{7.69}O_{2.13}(OCH_3)_{0.95}(SCH_2COOH)_{0.51}(SCH_2CONH_2)_{0.29}$ (252,00):
ber.: C 55,05, H 5,29, N 1,61, S 10,18, OCH_3 11,70 %,
gef.: C 55,07, H 5,30, N 1,62¹, S 10,14, OCH_3 11,77 %,
Baustück $C_9H_{9.44}O_{3.88}$.

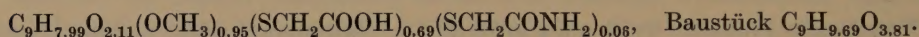
¹ DUMAS; bei direkter Destillation einer Probe mit Natronlauge aus einem KJELDAHL-Kölbchen wurde Ammoniak entsprechend 1,64 % N erhalten.

Die von dem Ammoniak ungelöste Holzmasse wurde einen Tag mit 100 ml 0,5-n. Natronlauge behandelt, wonach das Filtrat von dem dann ungelösten Zelluloserest mit 15 ml 5-n. Salzsäure nur 0,2 g eines griesigen Pulvers lieferte, welches in trockener Form 1,15 % N enthielt.

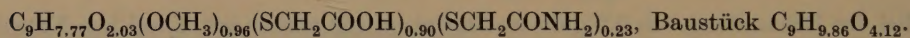
Bei einem neuen Versuch wurde die wie oben erhaltene Reaktionsmasse einen Tag mit 100 ml 0,5-n. Natronlauge digeriert, wonach das ungelöste abfiltriert und mit 100 ml 0,1-n. Natronlauge gewaschen wurde. Das braune Filtrat lieferte dann mit Salzsäure 3,3 g einer Li-Th A der Zusammensetzung



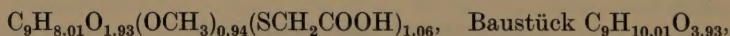
Von diesem Produkte wurden 2,8 g mit 20 ml konz. Ammoniak versetzt, wobei glatt eine klare, braune Lösung entstand, welche am folgenden Tage wie die entsprechende Lösung oben behandelt wurde. Dabei wurden 2,6 g eines blass cacaofarbenen, 4,14 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers erhalten, welches in trockenem Zustande die folgende Zusammensetzung zeigte:



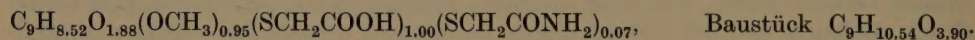
Als eine aus 10 g Holzmehl mit 50 g Thioglykolsäure usw. erhaltene Reaktionsmasse B wie oben mit Ammoniak behandelt wurde, wurden zum Schluss 3,7 g eines 3,57 % Feuchtigkeit enthaltenden Produktes erhalten, welches sich nach dem Trocknen der folgenden Zusammensetzung erwies:



Aus einer anderen Reaktionsmasse B wurden mit 150 ml 0,5-n. Natronlauge usw. 3,6 g einer 3,81 % Feuchtigkeit enthaltenden Li-Th B erhalten, welche in trockenem Zustande die Zusammensetzung

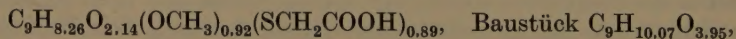


zeigte. Von diesem Produkte wurden 3,0 g wie oben mit 25 ml konz. Ammoniak behandelt, wobei zum Schluss 2,9 g eines blass cacaofarbenen Pulvers erhalten wurden, welches nach dem Trocknen die folgende Zusammensetzung zeigte:



3. Persulfatoxydationen

Von einer mit verdünnter Natronlauge behandelten Li-Th C der Zusammensetzung



ergaben 3,0 g mit 4,2 g Soda in 50 ml Wasser eine gelbbraune Lösung, welche mit 2,8 g Kaliumpersulfat versetzt wurde. Unter langsamer Gasentwicklung wurde bis zum folgenden Tage eine dunkelbraune Lösung erhalten, welche beim Zusatz von 25 ml 2-n. Salzsäure noch etwas Kohlendioxyd entwickelte und eine käsig-fällige Fällung ausschied. Die Fällung, welche am folgenden Tage aus einem voluminösen, feinkörnigen Pulver bestand, ging beim Erhitzen des Gemisches auf dem Wasserbade in eine teigige Masse über und bestand nach dem Erkalten aus 2,9 g eines schwach

griesigen, 6,43 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers, welches in trockenem Zustande analysiert wurde:

Für $C_9H_{7,56}O_{2,33}(OCH_3)_{0,87}(SCH_2COOH)_{0,76}$ (249,23):
 ber.: C 54,83, H 5,01, S 9,73, OCH_3 10,78 %,
 gef.: C 54,94, H 5,04, S 9,73, OCH_3 10,84 %.
 Baustück $C_9H_{9,19}O_{3,96}$.

Bei einem neuen Versuch wurden aus 3 g desselben Ausgangsmateriales mit 50 ml Wasser, 7 g Soda und 5,6 g Kaliumpersulfat zum Schluss 1,8 g hell beigefarbenes Pulver erhalten. Dieses enthielt 7,44 % Feuchtigkeit und zeigte nach dem Trocknen die Zusammensetzung

$C_9H_{7,38}O_{2,54}(OCH_3)_{0,81}(SCH_2COOH)_{0,74}$, Baustück $C_9H_{8,93}O_{4,09}$.

Die Mutterlauge des Oxydationsproduktes lieferte bei der Extraktion mit Äther nur 0,1 g eines gummiartigen Extraktes.

4. Thetinisierungsversuche

A. Versuche mit Methyljodid

a. Versuche mit Li-Th A

Von einer Li-Th A der Zusammensetzung

$C_9H_{7,77}O_{2,09}(OCH_3)_{0,92}(SCH_2COOH)_{0,79}$, Baustück $C_9H_{9,48}O_{3,80}$,

wurden bei 5 Versuchen je 4 g mit 20 ml Essigsäureäthylester und 10 g Methyljodid versetzt, wonach die Gemische unter gelegentlichen Umschüttelungen bei gewöhnlicher Temperatur verwahrt wurden, bis sie nach 7 bzw. 14, 28, 56 und 140 Tagen verarbeitet wurden. Die dann aus dunkelbraunen Lösungen und braunen Pulvern bestehenden Gemische wurden filtriert, die Pulver mit Essigester gewaschen und auf Tonscherben getrocknet. Das nach 7 Tagen erhaltene Produkt wog 3,2 g, enthielt 2,07 % Feuchtigkeit und zeigte nach dem Trocknen die Zusammensetzung:

Für $C_9H_{7,70}O_{2,18}J_{0,16}(OCH_3)_{1,09}(SCH_2COOH)_{0,31}^1$ (233,12):
 ber.: C 55,18, H 5,15, J 8,70, S 4,26, OCH_3 14,51 %,
 gef.: C 55,08, H 5,14, J 8,83, S 4,26, OCH_3 14,50 %.

Von dem analysierten Produkte wurden 1,3 g eine Woche mit 20 ml 1-n. Natronlauge behandelt, wobei ein trübes, nach Dimethylsulfid riechendes Gemisch erhalten wurde. Nach Abfiltrieren, Waschen mit Wasser und Trocknen wie oben wog das neue Produkt 1,0 g und bestand aus einem gelbbraunen Pulver, welches 6,88 % Feuchtigkeit enthielt. In trockenem Zustande und mit Korrektur für 6,22 % Asche zeigte es die Zusammensetzung:

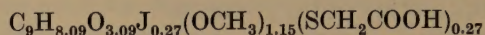
Für $C_9H_{7,60}O_{2,11}(OCH_3)_{1,07}(SCH_2COOH)_{0,26}^2$ (206,41):
 ber.: C 61,62, H 5,66, S 4,04, OCH_3 16,09 %,
 gef.: C 61,60, H 5,66, S 4,05, OCH_3 16,09 %.
 Baustück $C_9H_{8,93}O_{3,44}$.

¹ Oder ev. $C_9H_{7,70}O_{2,34}(OCH_3)_{0,93}(SCH_2COOH)_{0,15}[S(J)(CH_3)CH_2COOH]_{0,16}$.

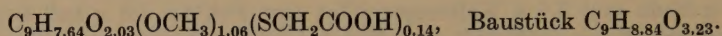
² Oder ev. $C_9H_{7,74}O_{2,25}(OCH_3)_{0,93}(SCH_2COOH)_{0,12}[S(CH_3)CH_2COO]_{0,14}$.

B. HOLMBERG, *Entschwefelungsversuche mit Lignin-Thioglykolsäuren*

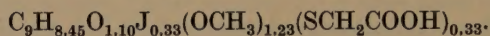
Nach 14tägiger Reaktionszeit wurden zuerst 3,4 g ungelöstes Produkt mit 2,00 % Feuchtigkeit und in trockener Form der Zusammensetzung



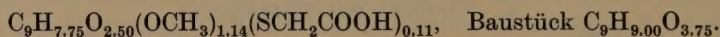
erhalten. Davon ergaben 1,2 g nach der Behandlung mit Natronlauge 1,0 g eines Pulvers mit 5,95 % Feuchtigkeit und in trockener Form und mit Korrektur für 2,82 % Asche der Zusammensetzung



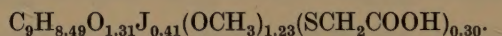
Das nach 28 Tagen erhaltene Methylierungsprodukt wog 3,7 g, enthielt 1,58 % Feuchtigkeit und zeigte in trockenem Zustande die Zusammensetzung



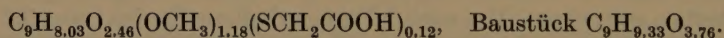
Aus 1,3 g dieses Produktes wurden mit 20 ml 1-n. Natronlauge 0,9 g eines gelbbraunen Pulvers erhalten, welches 5,93 % Feuchtigkeit enthielt und in trockener Form und mit Korrektur für 2,31 % Asche die folgende Zusammensetzung zeigte:



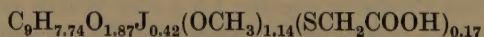
Nach der Reaktionszeit von 56 Tagen wurden 3,6 g eines Produktes mit 1,65 % Feuchtigkeit erhalten, welches in trockenem Zustande die folgende Zusammensetzung zeigte:



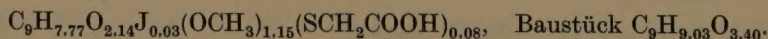
Von diesem Produkte lieferten 2,6 g nach der Behandlung mit 25 ml Natronlauge 1,7 g ungelöstes Pulver, welches 7,44 % Feuchtigkeit enthielt und im trockenen Zustande und mit Korrektur für 1,53 % Asche die folgende Zusammensetzung zeigte:



Als zum Schluss die Bearbeitung des Reaktionsgemisches erst nach 140 Tagen vorgenommen wurde, wurden 4,2 g braunes Pulver erhalten, welches mit 25 ml Wasser behandelt wurde, wonach es 3,5 g wog, 2,93 % Feuchtigkeit enthielt und nach dem Trocknen die Zusammensetzung



zeigte. Von diesem Pulver wurden 3,0 g 2 Tage mit 20 ml 1-n. Natronlauge behandelt, wonach es 2,2 g wog, 7,95 % Feuchtigkeit enthielt und in trockener Form und mit Korrektur für 1,39 % Asche die folgende Zusammensetzung zeigte:



Das Filtrat von dem mit Wasser behandelten Reaktionsprodukte lieferte bei freiwilliger Eindunstung 0,7 g eines kristallinischen Rückstandes. Dieser lieferte mit etwas Wasser eine braune, übelriechende Lösung, welche bei freiwilliger Eindunstung bis fast zur Trockenheit beim Pressen zwischen Filtrierpapier einen aus Trimethylsulfoniumjodid bestehenden Rückstand lieferte. Beim Erhitzen fing das Präparat bei

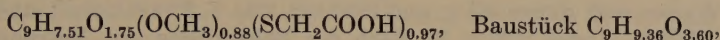
170° an zu sintern und verflüchtigte sich dann bei 172° unter Entwicklung eines übelriechenden Gases (vgl. STRÖMHOLM, 7).

Für C_3H_9JS (204,09):

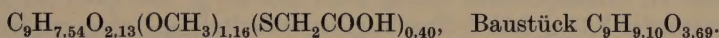
ber.: C 17,65,	H 4,45,	J 62,19,	S 15,71 %,
gef.: C 17,63,	H 4,45,	J 62,33,	S 15,62 %.

b. Versuche mit Li-Th B

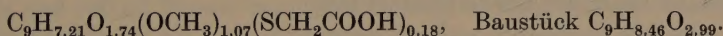
Nach 10tägiger Einwirkung von 12 g Methyljodid in 25 ml Essigsäureäthylester auf 4,5 g einer Li-Th B der Zusammensetzung



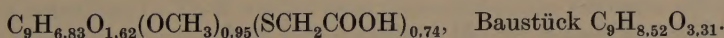
waren 3,6 g dunkelbraune, spröde Massen ausgeschieden. Nach Pulverisierung und 3tägiger Digerierung dieses Produktes mit 100 ml Wasser waren 2,2 g davon ungelöst verblieben, und nach der Behandlung von 2,0 g davon mit 20 ml 1-n. Natronlauge wurden 1,3 g ungelöstes Material zurückgewonnen, welches 12,54 % Feuchtigkeit enthielt und in trockenem Zustande und mit Korrektion für 7,69 % Asche die folgende Zusammensetzung zeigte:



Als 5 g derselben Li-Th B mit 15 g Methyljodid in 30 ml Essigester 40 Tage behandelt wurden, wurden dann 5 g ungelöstes Pulver erhalten, welches 1,57 % Feuchtigkeit und in trockener Form 31,02 % J und 5,41 % S enthielt. Von diesem Pulver wurden 4,5 g aufs Neue 60 Tage mit Methyljodid wie vorher behandelt, wonach 3,9 g eines ungelösten Pulvers mit 2,65 % Feuchtigkeit und nach dem Trocknen 25,36 % J und 4,79 % S zurückgewonnen wurden. Nach der Behandlung von 3 g dieses Pulvers mit 25 ml 1-n. Natronlauge wog es 2 g, enthielt 4,87 % Feuchtigkeit und ergab bei der Analyse die Zusammensetzung

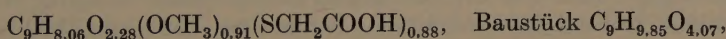


Als 1,0 g dieses Produktes 4 Stunden auf dem Wasserbade mit 10 g Thioglykolsäure und 1,0 ml 2-n. Salzsäure erhitzt wurde, wurden dann aus der Lösung 1,2 g einer Li-Th B erhalten, welche aus einem cacaofarbenen, locker zusammengesinterten, 4,60 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers bestand. In trockenem Zustande ergab das Produkt die Zusammensetzung



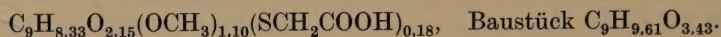
c. Versuche mit Li-Th C

Von einer Li-Th C der Zusammensetzung

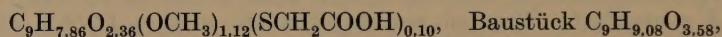


wurden 4,0 g während 14 Tage mit 10 g Methyljodid in 20 ml Essigester behandelt, wonach beim Abfiltrieren, Waschen mit 30 ml Essigester und Trocknen an der Luft 3,6 g hellbraunes Pulver erhalten wurden. Nach Behandlung mit 25 ml Wasser wog

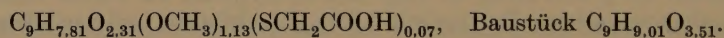
das Produkt 3,2 g und enthielt 3,86 % Feuchtigkeit sowie in trockener Form 12,11 % J und 3,05 % S. Als 2,0 g davon 4 Tage mit 20 ml 1-n. Natronlauge digeriert wurden, wurden dann beim Abfiltrieren und Waschen mit 650 ml Wasser 1,7 g an der Luft getrocknetes, schwach zusammengesintertes, braungelbes Pulver erhalten, welches 10,82 % Feuchtigkeit enthielt und nach dem Trocknen und mit Korrektur für 4,01 % Asche die folgende Zusammensetzung zeigte:



Bei einem zweiten Versuche wurde das Reaktionsgemisch erst nach 70 Tagen verarbeitet, wobei zuerst 3,8 g Reaktionsprodukt erhalten wurden. Nach der Behandlung mit Wasser wog dieses 3,1 g und enthielt 2,51 % Feuchtigkeit und nach dem Trocknen 16,72 % J und 2,29 % S. Nach der Behandlung mit Natronlauge gaben 2,5 g davon zum Schluss 2,05 g hell zimtfarbenes Pulver, welches 6,92 % Feuchtigkeit enthielt. Im trockenen Zustande und mit Korrektur für 2,30 % Asche zeigte es die Zusammensetzung

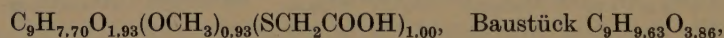


Bei einem dritten Versuche dauerte die Umsetzung mit Methyljodid 126 Tage. Die Ausbeute an Primärprodukt betrug auch hier 3,8 g, und nach der Behandlung mit Wasser wurden 3,15 g, 3,80 % Feuchtigkeit enthaltendes Pulver zurückgewonnen, welches nach dem Trocknen 15,92 % J und 1,76 % S enthielt. Als 3,0 g davon 4 Tage mit 30 ml 1-n-Natronlauge digeriert wurden, lieferte das Gemisch danach 2,4 g eines beigefarbenen, 9,24 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers, welches nach dem Trocknen und mit Korrektur für 1,82 % Asche die folgende Zusammensetzung zeigte:



B. Versuche mit Monohalogenessigsäuren

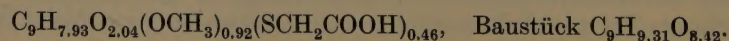
Von einer Li-Th B der Zusammensetzung



wurden 5,65 g in 20 ml 1-n. Natronlauge gelöst und die Lösung mit 4,8 g mit derselben Natronlauge neutralisierter *Monochloressigsäure* versetzt. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbade erhitzt und dabei nach je ΔS Stunden gegen Lackmuspapier mit der 1-n. Lauge neutralisiert, wobei die unten angegebenen Mengen der Lauge verbraucht wurden,

$\Delta S:$	0,5	1	2	3	4	4	4
ml Lauge	4,0	5,3	9,1	8,3	5,9	3,5	1,0.

Summe Lauge 37,1 ml. Die Lösung lieferte dann mit 25 ml 5-n. Salzsäure eine käsige, am folgenden Tage voluminös pulverförmige Fällung, welche auf dem Wasserbade in eine teigige, nach dem Erkalten griesig harzige Masse überging. Nach Reiben mit Wasser usw. bestand das Produkt zum Schluss aus 4,55 g eines hell braungelben Pulvers, welches 6,50 % Feuchtigkeit enthielt und in trockenem Zustande die folgende Zusammensetzung zeigte:



Bei einem neuen Versuche wurden 5,6 g einer Li-Th B der Zusammensetzung



mit 100 ml Wasser, 4,8 g Monochloressigsäure und 17,2 g Soda versetzt, wonach das Gemisch auf dem Wasserbade erhitzt wurde. Hierbei entstand eine Lösung, aus welcher Kohlendioxyd entwickelt wurde; als die Gasentwicklung nach 12 Stunden aufgehört hatte, wurde die Lösung mit 50 ml Wasser verdünnt und dann mit 25 ml 5-n. Salzsäure angesäuert, wonach wie oben 4,4 g eines herausgefällten Produktes erhalten wurden, welches 4,53 % Feuchtigkeit enthielt und nach dem Trocknen die folgende Zusammensetzung zeigte:



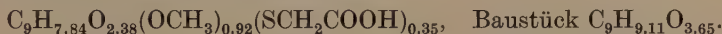
Als eine Lösung von 3,0 g einer Li-Th C der Zusammensetzung



in 20 ml 0,5-n. Natronlauge mit einer neutralen Lösung von 4,3 g *Monobromessigsäure* in 1-n. Natronlauge versetzt wurde, verbrauchte das Gemisch nach je ΔM Minuten auf dem Wasserbade die folgenden Mengen 1-n. Natronlauge:

ΔM :	15	30	60	120
ml Lauge	11	7	5	1.
Summe Lauge 24 ml.				

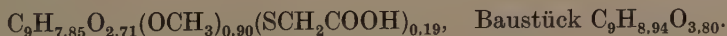
Am folgenden Tage wurde ein wenig einer gelatinösen Masse abfiltriert, wonach das nach Guajacol und Vanillin riechende Filtrat mit 10 ml 2-n. Salzsäure eine käsige Fällung lieferte, welche nach der Behandlung wie oben aus 2,0 g eines schwach griesigen, korkfarbenen Pulvers bestand, 5,78 % Feuchtigkeit enthielt und in trockener Form die folgende Zusammensetzung zeigte:



Von derselben Li-Th B wurden 5,6 g mit einer aus 7,0 g Monobromessigsäure, 17,2 g Soda und 100 ml Wasser bereiteten Lösung versetzt und das Gemisch auf dem Wasserbade erhitzt, wobei nach 3 Stunden die Gasentwicklung aufhörte. Nach noch 3 Stunden und Erkalten wurden 25 ml 5-n. Salzsäure hinzugefügt, wobei eine käsige Fällung entstand, welche zum Schluss aus 4,3 g eines korkfarbenen Pulvers bestand, 4,42 % Feuchtigkeit enthielt und in trockenem Zustande folgende Zusammensetzung zeigte:



Als 5,6 g derselben Li-Th B wie bei dem voranstehenden Versuche mit einer Lösung von 9,3 g *Monojodessigsäure* und 17,2 g Soda in 100 ml Wasser auf dem Wasserbade erhitzt wurden, trat eine lebhafte Gasentwicklung ein, welche nach 2 Stunden aufhörte. Nach noch 2 Stunden und Erkalten war eine unbedeutende Menge eines weichen Bodenbeschlages abgeschieden, und die davon abdekantierte Lösung lieferte mit Salzsäure usw. wie oben zum Schluss 4,05 g eines bräunlich gelben Pulvers, welches 3,58 % Feuchtigkeit enthielt und in trockener Form sich von folgender Zusammensetzung erwies:



LITERATUR

1. B. HOLMBERG, Arkiv för Kemi 12, 41 (1957).
2. B. HOLMBERG u. N. GRALÉN, Ing. Vetensk. Akad. Handl. 162 (1942).
3. B. HOLMBERG, Österreich. Chem.-Ztg. 1940, Nr. 15/16.
4. ——— Diese Mitteilung.
5. ——— Ing. Vetensk. Akad. Handl. 103, 24 (1930).
6. ——— Ark. Kem. Mineral. Geol. 12A, No 11 (1936).
7. D. STRÖMHOLM, Ber. d. D. Chem. Ges. 33, 827 (1900).

Tryckt den 2 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Fichtenlignine und Thiobenzhydrazid

(Ligninuntersuchungen XXII¹)

Von BROR HOLMBERG

Beim Umsatz von einem Äthyllignin der Zusammensetzung



mit Thiobenzhydrazid in alkoholischer Lösung erhielt der Verf. (2) ein Produkt der Zusammensetzung



was einer etwa 50prozentigen Hydrazonbildung je Phenylpropaneinheit entspricht. In der angeführten Mitteilung wurde auch erwähnt, dass das Äthyllignin zu etwa 33 % in Äther löslich ist, und als später die mittels Äthers erhaltenen Komponenten des Totallignins mit dem Thiobenzhydrazid umgesetzt wurden, entstand aus dem vom Äther nicht gelösten Anteil ein Thiohydrazon der Zusammensetzung



während aus dem ätherlöslichen Materiale ein Produkt der folgenden Zusammensetzung erhalten wurde:



Da hier die Hydrazonbildung in beiden Fällen wesentlich weiter vor sich gegangen war, als bei dem Versuche mit dem Totallignin, wurden auch Versuche mit den Komponenten eines neu dargestellten Äthyllignins angestellt, wobei teils die Einwirkungszeiten variiert wurden, teils auch Versuche mit Zusatz von Salzsäure zu den Reaktionsgemischen vorgenommen wurden. Die Resultate gehen aus der Tabelle I hervor.

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, verläuft die Umsetzung der Äthyllignine mit dem Thiobenzhydrazid rasch und ist nach einigen Tagen bei gewöhnlicher Temperatur praktisch zu Ende. Eine Einwirkung der Salzsäure ist kaum zu konstatieren (vgl. die folgenden Tabellen), und aus den Analysen ersieht man, dass die ätherlösliche Komponente auch bei diesen Versuchen vollständiger als die andere in Thiobenzhydrazon übergegangen ist. In beiden Fällen sind indessen die Umsetzungen nur etwa 70 % von der entsprechenden bei den früheren Versuchen gewesen.

Auch einige der vom Verf. früher (3) mit Thioglykolsäure umgesetzten Fichtenlignine wurden betreffs ihres Verhaltens dem Thiobenzhydrazid gegenüber geprüft, wobei die

¹ Ligninuntersuchungen XXI: Entschwefelungsversuche mit Lignin-Thioglykolsäuren, siehe (1).

Tabelle 1.

Tage	% C	% H	% N	% S	S/C ₉ ^a
<i>Von Äther nicht gelöstes Äthyllignin:</i>					
1	63,7	5,89	4,53	5,50	0,47
6	63,0	5,88	4,64	5,82	0,50
6 ^b	63,7	5,93	3,74	4,75	0,41
<i>Von Äther gelöstes Äthyllignin:</i>					
1	63,7	5,93	5,39	6,35	0,66
6	63,4	5,94	5,60	6,59	0,68
6 ^b	63,2	5,73	5,51	6,82	0,70

^a Geschätzt.^b Mit Zusatz von Salzsäure.

Tabelle 2.

Material	% N	% S	S/C ₉
Essigsäurelignin, von Alkohol nicht gelöst	2,92	3,00	0,20
Desgl., von Alkohol gelöst	3,38	3,40	0,22
Cuproxamlignin, ohne Zusatz	1,53	1,03	0,06
Desgl., mit Salzsäure	2,59	2,54	0,17
Desgl., mit Natronlauge	1,75	1,28	0,08
NaOH-Lignin, 2 St. bei 170°, von Alkohol nicht gelöst	2,18	2,54	0,16
Desgl., aber von A. gelöst	5,04	5,83	0,43
NaOH-Lignin, 5 St. bei 170°, von A. nicht gelöst	2,19	2,39	0,15
Desgl., aber von A. gelöst	3,44	4,03	0,26

Tabelle 3.

Reaktion des Mediums	Reaktionszeit Tage	% N	% S	S/C ₉
Neutral	7	1,98	1,59	0,11
„	21	2,21	1,72	0,12
Sauer	7	2,97	4,03	0,29
Alkalisch	7	3,10	3,02	0,21

in der Tabelle 2 angegebenen N- und S-Gehalte sowie die Anzahl der Hydrazongruppen je C₉-Baustück (S/C₉) der entstandenen Produkte gefunden wurden.

Während die Äthyllignine mit Thiobenzhydrazid Produkte mit S/C₉ = 0,5–0,9 und ein aus einem Natronlignin eines mit S/C₉ = 0,43 ergeben haben, liegen die entsprechenden Hydrazonwerte in den übrigen Fällen zwischen 0,06 und 0,26. Mit diesen Werten stimmen so wie so die von BJÖRKMAN und PERSON (4) mit aus fein gemahlenem Fichtenholz extrahiertem Lignin angestellten Thiobenzhydrazid-Versuche überein, indem sie unter verschiedenen Bedingungen Produkte mit den in der Tabelle 3 angeführten S/C₉-Werten erhielten:

In dem oben Angeführten ist stillschweigend vorausgesetzt, dass die entstandenen Produkte aus Thiobenzhydrazonen bestehen, und dass die Anzahl solcher Gruppen proportional den S-Gehalten der Präparate sind. In quantitativer Hinsicht sind jedoch die so errechneten Hydrazongehalte mit grossen Fehlerquellen verschiedener Art behaftet, aber aus ihnen lässt sich wenigstens schliessen, dass der Gehalt des Fichtenholzes an Carbonylgruppen im allgemeinen nur sehr bescheiden ist. Inwieweit dieser Gehalt durch die Methode zur Isolierung des Lignins beeinflusst werden kann, ist schwer zu beurteilen, aber wenigstens bei der Alkoholyse des Fichtenholzes kommt anscheinend eine reichliche Mobilisierung von solchen Gruppen vor, was wenigstens teilweise in Übereinstimmung mit der Bildung z. B. des Äthoxypropiovanillons bei anhaltender Kochung von „spruce“ mit chlorwasserstoffhaltigem, abs. Alkohol (HIBBERT u. Mitarb. (5) und später) stehen kann.

Beschreibung der Versuche

1. Äthyllignine und Thiobenzhydrazid

Als 25,5 g in der früher beschriebenen Weise dargestelltes Äthyllignin (2) mit Äther behandelt wurden, verblieben 17 g davon ungelöst, während aus der entstandenen Lösung nach freiwilliger Eindunstung und Umfällen des Rückstandes aus seiner Lösung in Natronlauge 4,6 g zimtfarbenes, nach Vanillin riechendes Pulver erhalten wurden. Von dem ungelösten Anteil wurden 3,0 g eine Stunde mit 50 ml Alkohol¹ versetzt und das Gemisch eine Stunde geschüttelt, wonach zu dem Filtrate von einer Spur einer ungelösten, klebrigen Masse 3 g Thiobenzhydrazid gesetzt wurden. Die am folgenden Tage unveränderte Lösung lieferte dann bei freiwilliger Eindunstung einen dunkelbraunen, sirupös gummiartigen Rest, welcher bei der Behandlung mit 30 ml 1-n. Natronlauge 0,1 g ungelöstes, unreines 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiadiazol vom Schmp. 135–140° lieferte. Das Filtrat davon wurde mit 20 ml 2-n. Salzsäure versetzt, wobei eine Fällung entstand, welche bis zum folgenden Tage in ein schwach griesiges Pulver überging und nach Abfiltrieren, Reiben mit Wasser usw. zum Schluss aus 3,4 g eines graubraunen, 1,46 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers bestand. In getrocknetem Zustande² enthielt das Produkt:

Für $C_9H_{7,96}O_{2,07}(OCH_3)_{0,93}(OC_2H_5)_{0,28}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0,62} = C_{14,83}H_{15,87}O_{3,28}N_{1,24}S_{0,62}$ (283,84):

ber.: C 62,75, H 5,64, N 6,12, S 7,00, „OCH₃“³ 13,23 %,

gef.: C 62,74, H 5,63, N 6,00, S 7,19, „ 13,18 %.

Von dem von Alkohol gelösten und aus seiner Lösung in Natronlauge umgefällten Äthyllignin lieferten 3,0 g mit 3 g Thiobenzhydrazid und 50 ml Alkohol nach einer Woche wie oben zum Schluss 4,6 g eines braungelben, 0,83 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers.

Für $C_9H_{10,05}O_{1,73}(OCH_3)_{0,94}(OC_2H_5)_{0,40}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0,89} = C_{16,97}H_{20,21}O_{3,07}N_{1,78}S_{0,89}$ (326,77):

ber.: C 62,37, H 6,23, N 7,63, S 8,73, „OCH₃“³ 12,73 %,

gef.: C 62,60, H 5,85, N 7,76, S 8,63, „ 12,78 %.

¹ Hier wie überall 95-proz.

² Alle Analysen beziehen sich auf getrocknete Proben.

³ Bedeutet als OCH₃ berechnetes OCH₃ + OC₂H₅.

Als 17,4 g eines in dem 10fachen Masstab neu dargestellten Äthyllignins mit Äther behandelt wurden, betrug die ungelöste Komponente 11,4 g und die in Lösung gegangene und aus ihrer Lösung in Natronlauge umgefällte 3,6 g. Proben von diesen Präparaten wurden in üblicher Weise, aber auch unter Zusätzen von Salzsäure, mit Thiobenzhydrazid behandelt, wobei Produkte mit den in der Tabelle 1 angegebenen Elementarzusammensetzungen erhalten wurden.

2. Essigsäurelignine und Thiobenzhydrazid

Von dem von Alkohol nicht gelösten Essigsäurelignin der Zusammensetzung $C_9H_{7.61}O_{2.39}(OCH_3)_{0.89}$ (3, S. 51) wurden 1,4 g unter gelegentlichen Umschüttelungen 17 Tage mit 2 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol behandelt, wonach das Gemisch aus einer braunen Lösung und einer ungelösten, plastischen Masse bestand. Diese Masse lieferte mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge eine dunkelbraune Lösung, aus welcher mit 10 ml 2-n. Salzsäure eine käsige Fällung ausgeschieden wurde. Am folgenden Tage bestand die Fällung aus einem voluminösen Pulver, welches auf dem Wasserbade etwas grobkörniger wurde und nach Abfiltrieren usw. zum Schluss aus 1,4 g eines locker zusammengesinterten, hellbraunen, 4,09 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers bestand.

Für $C_9H_{7.38}O_{2.28}N_{0.044}(OCH_3)_{0.90}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0.20} = C_{11.30}H_{11.28}O_{3.18}N_{0.444}S_{0.20}$ (210,59):

ber.: C 64,44, H 5,40, N 2,95, S 3,05, OCH_3 13,26 %,

gef.: C 64,45, H 5,40, N 2,92, S 3,00, OCH_3 13,28 %.

Die abdekantierte Reaktionslösung lieferte bei freiwilliger Eindunstung, Lösen des Restes in Natronlauge usw. zum Schluss 0,4 g eines 0,10 % Feuchtigkeit enthaltenden Produktes, welches mit Korrektion für 0,52 % Asche 59,34 % C, 5,37 % H, 10,65 % N und 12,65 % S enthielt.

Von dem alkohollöslichen Anteil des Essigsäurelignins der Zusammensetzung $C_9H_{9.08}O_{2.06}(OCH_3)_{0.73}$ (3, S. 51) wurden 3,0 g mit der gleichen Menge Thiobenzhydrazid in 30 ml Alkohol wie oben während 8 Tage behandelt, wonach das Gemisch aus einem klebrigen Bodenbelag und einer dunkelbraunen Lösung bestand. Der Belag wurde von 10 ml 1-n. Natronlauge glatt gelöst und lieferte nach Ansäuern der entstandenen Lösung usw. zum Schluss 0,5 g eines hellbraunen Pulvers, welches 4,08 % Feuchtigkeit enthielt.

Für $C_9H_{7.47}O_{2.21}(OCH_3)_{0.85}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0.21} = C_{11.32}H_{11.28}O_{3.06}N_{0.42}S_{0.21}$ (208,89):

ber.: C 65,08, H 5,44, N 2,82, S 3,22, OCH_3 12,63 %,

gef.: C 65,10, H 5,45, N 2,81, S 3,15, OCH_3 12,59 %.

Aus der von dem Belag abdekantierten Reaktionslösung entstand bei freiwilliger Eindunstung eine halbfeste Masse, welche in 30 ml 1-n. Natronlauge gelöst und dann mit Salzsäure herausgefällt wurde, wonach das Produkt zum Schluss aus 2,8 g eines braungelben, 2,33 % Feuchtigkeit enthaltenden, locker zusammengesinterten Pulvers bestand.

Für $C_9H_{8.80}O_{2.04}N_{0.06}(OCH_3)_{0.70}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0.22} = C_{11.24}H_{12.22}O_{3.74}N_{0.50}S_{0.22}$ (205,20):

ber.: C 65,79, H 6,00, N 3,41, S 3,44, OCH_3 10,59 %,

gef.: C 65,83, H 6,01, N 3,38, S 3,40, OCH_3 10,58 %.

3. Cuproxamlignin und Thiobenzhydrazid

Von dem Cuproxamlignin der Zusammensetzung $C_9H_{8,24}O_{2,73}(OCH_3)_{0,92}$ (3, S. 50) wurden 3,0 g mit 30 ml Alkohol und 3,0 g Thiobenzhydrazid versetzt und das Gemisch, gelegentlich umgeschüttelt, 3 Wochen bei gewöhnlicher Temperatur verwahrt. Beim Abfiltrieren, Waschen mit 20 ml Alkohol und Trocknen an der Luft wurden dann 3,2 g eines braungelben Pulvers erhalten, welches $1\frac{1}{2}$ Stunden mit 50 ml 0,5-n. Natronlauge geschüttelt wurde. Danach wurden 3,2 g ungelöstes Pulver zurückgewonnen, während das Filtrat davon beim Ansäuern nur schwach opaleszent wurde. Das ungelöste Material wurde nach Pulverisierung mit 25 ml 1-n. Salzsäure einen Tag behandelt und bestand dann nach Abfiltrieren, Waschen mit Wasser usw. aus 3,0 g eines 6,10 % Feuchtigkeit enthaltenden, kandisfarbenen Pulvers.

Für $C_9H_{8,03}O_{2,65}N_{0,09}(OCH_3)_{0,91}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0,06} = C_{10,33}H_{11,12}O_{3,56}N_{0,21}S_{0,06}$ (197,09):

ber.: C 62,95, H 5,69, N 1,49, S 0,98, OCH_3 14,33 %,

gef.: C 62,96, H 5,68, N 1,53, S 1,03, OCH_3 14,22 %.

Bei einem neuen Versuche wie oben, aber mit 5 ml 5-n. Salzsäure zugesetzt, wurden zuerst 3,7 und zum Schluss 3,0 g braungelbes Pulver erhalten, welches 5,20 % Feuchtigkeit enthielt.

Für $C_9H_{7,70}O_{2,65}N_{0,06}(OCH_3)_{0,93}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0,17} = C_{11,12}H_{11,51}O_{3,56}N_{0,40}S_{0,17}$ (213,48):

ber.: C 62,56, H 5,43, N 2,62, S 2,55, OCH_3 13,52 %,

gef.: C 62,56, H 5,44, N 2,59, S 2,54, OCH_3 13,56 %.

Als zum Schluss 3,0 g des Cuproxamlignins mit 3,0 g Thiobenzhydrazid in 40 ml 1-n. Natronlauge 4 Wochen behandelt wurden, wurden 3,4 g ungelöstes Pulver erhalten, während das Filtrat davon beim Ansäuern nur schwach emulgiert wurde und dann eine unbedeutende Menge eines klebrigen Pulvers absetzte. Das von der Lauge ungelöste Produkt wurde mit 25 ml 1-n. Salzsäure verrieben und lieferte dann 3,1 g eines ungelösten, graugelben, 6,09 % Feuchtigkeit enthaltenden Pulvers.

Für $C_9H_{8,09}O_{2,65}N_{0,09}(OCH_3)_{0,90}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0,08} = C_{10,46}H_{11,27}O_{3,48}N_{0,25}S_{0,08}$ (198,73):

ber.: C 63,21, H 5,72, N 1,76, S 1,29, OCH_3 14,05 %,

gef.: C 63,21, H 5,72, N 1,75, S 1,28, OCH_3 14,10 %.

4. Alkalilignine und Thiobenzhydrazid

Von dem von Alkohol nicht gelösten Anteil eines nach 2stündiger Erhitzung bei 170° hergestellten Natronlignins, welcher die Zusammensetzung $C_9H_{7,08}O_{2,31}(OCH_3)_{0,85}$ zeigte (3, S. 55), wurde 1,0 g mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol versetzt, wonach das Gemisch, gelegentlich umgeschüttelt, nach 5 Wochen aus einer braunen Lösung und ungelösten, harzigen Massen bestand. Die Lösung lieferte beim Verarbeiten nichts von Interesse, und nach Auflösung der harzigen Massen in 20 ml 0,5-n. Natronlauge lieferte die entstandene, dunkelbraune Lösung beim Ansäuern eine gelatinös käsig Fällung, welche bis zum folgenden Tage in ein voluminöses Pulver übergang. Auf dem Wasserbade wurde diese Fällung etwas grobkörniger und nach Abfiltrieren usw. bestand es zum Schluss aus 0,9 g braunen, zusammengesinterten Massen, welche 3,55 % Feuchtigkeit enthielten.

Für $C_9H_{7,38}O_{2,15}(OCH_3)_{0,85}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0,16} = C_{10,97}H_{10,89}O_{3,00}N_{0,32}S_{0,16}$ (200,34):

ber.: C 65,76, H 5,48, N 2,24, S 2,56, OCH_3 13,17 %,

gef.: C 65,78, H 5,48, N 2,18, S 2,54, OCH_3 13,18 %.

Der vom Alkohol gelöste Teil desselben Totallignins zeigte die Zusammensetzung $C_9H_{7.71}O_{2.25}(OCH_3)_{0.78}$ (3, S. 55) und davon ergab 1,0 g mit 1,5 g Thiobenzhydrazid und 20 ml Alkohol eine dunkelbraune Lösung, welche nach einer Woche bei freiwilliger Eindunstung, Lösen des Rückstandes in 20 ml 1-n. Natronlauge und Fällen mit Salzsäure usw. 1,4 g braungelbes, 2,20 % Feuchtigkeit enthaltendes Pulver lieferte.

Für $C_9H_{8.27}O_{2.08}(OCH_3)_{0.75}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0.43} = C_{12.76}H_{13.10}O_{2.83}N_{0.86}S_{0.43}$ (237,57):
 ber.: C 64,51, H 5,56, N 5,07, S 5,80, OCH_3 9,80 %,
 gef.: C 64,51, H 5,56, N 5,04, S 5,83, OCH_3 9,79 %.

Als nach 5stündiger Erhitzung bei 170° erhaltenes Natronlignin mit Alkohol behandelt wurde, verblieb ein Teil ungelöst, welcher die Zusammensetzung $C_9H_{7.49}O_{2.27}(OCH_3)_{0.86}$ zeigte (3, S. 57). Aus diesem Lignin wurden wie bei dem entsprechenden oben mit Thiobenzhydrazid 0,95 g braune Kuchen erhalten, welche ein hellbraunes, 3,12 % Feuchtigkeit enthaltendes Pulver lieferten.

Für $C_9H_{7.05}O_{2.01}(OCH_3)_{0.83}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0.15} = C_{10.88}H_{10.44}O_{2.84}N_{0.30}S_{0.15}$ (195,64):
 ber.: C 66,79, H 5,38, N 2,15, S 2,46, OCH_3 13,17 %,
 gef.: C 66,79, H 5,38, N 2,19, S 2,39, OCH_3 13,19 %.

Von der alkohollöslichen Komponente der Zusammensetzung $C_9H_{7.54}O_{2.18}(OCH_3)_{0.77}$ (3, S. 57) desselben Totallignins lieferten 1,5 g beim Schütteln mit 2,2 g Thiobenzhydrazid in 30 ml Alkohol im Laufe einer Stunde eine dunkelbraune Lösung, welche nach einer Woche und freiwilliger Eindunstung usw. wie bei dem entsprechenden Versuche oben 1,6 g eines 2,83 % Feuchtigkeit enthaltenden Reaktionsproduktes ergab.

Für $C_9H_{7.44}O_{2.03}(OCH_3)_{0.77}(NNH \cdot CS \cdot C_6H_5)_{0.26} = C_{11.58}H_{11.31}O_{2.80}N_{0.52}S_{0.26}$ (211,01):
 ber.: C 65,97, H 5,40, N 3,45, S 3,95, OCH_3 11,32 %,
 gef.: C 65,94, H 5,40, N 3,44, S 4,03, OCH_3 11,33 %.

Akarp, Schweden, Mai 1958.

LITERATUR

1. B. HOLMBERG, Arkiv för Kemi 13, 199 (1958).
2. — Svensk Papperstidn. 50, H. 11B (1947).
3. — Arkiv för Kemi 12, 41 (1957).
4. A. BJÖRKMAN u. B. PERSON, Svensk Papperstidn. 60, 285 (1957).
5. A. B. CRAMER, M. J. HUNTER u. H. HIBBERT, Journ. Am. Chem. Soc. 61, 509 (1939).

Tryckt den 2 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Isolation and structure of a melanocyte-stimulating hormone from pig pituitary glands

By PAUL ROOS

With 4 figures in the text

Introduction

This paper includes a brief summary of the work presented in the references 1-5 and in addition some complementary experiments are discussed.

The presence of a melanocyte-stimulating activity in the pars intermedia of the pituitary of vertebrates has been recognized for about 35 years. The earlier attempts made in order to prepare potent extracts of this activity, mainly from beef and pig pituitary glands, have been reviewed by van Dyke (6, 7) and by Landgrebe *et al.* (8, 9). At the time when the last of these reviews was prepared, the accumulated data indicated that the activity was associated with a polypeptide of comparatively low molecular weight, but it still remained to isolate this peptide in pure form. Shortly afterwards, however, a renewed interest in the isolation of the active principle, mainly depending on a presumed relationship (and even identity) between the corticotropins (ACTH) and the melanocyte-stimulating hormones, led to the isolation from pig pituitary glands of two different peptides both possessing very high potencies. One of these hormones was isolated by Lerner and Lee (10), the other was for the first time isolated in this laboratory (1) and by Benfey and Purvis (11) and later on by Geschwind *et al.* (12). Recently Geschwind *et al.* (13) have also isolated a melanocyte-stimulating peptide from beef pituitaries.

Further studies on these active substances have for each of them revealed the occurring amino acids and the complete structure (2, 3, 4, 14, 15, 16, 17). The elucidated structures all exhibited a remarkable resemblance to that of the corticotropins (18, 19, 20) and in the peptide studied by the author this resemblance was manifested by a common heptapeptide sequence (4). This observation in connection with the known intrinsic melanocyte-stimulating activity of ACTH has (18, 21) stimulated the search in both hormones for the essential minimum structural requirements for melanocyte-stimulating activity (5, 22, 23).

A review over melanocyte-stimulating hormones has recently been written by Li (24).

Terminology

Since Zondek and Krohn (25) in 1932 introduced the name "intermedin" for the melanocyte-stimulating principle studied by them, various other names have been

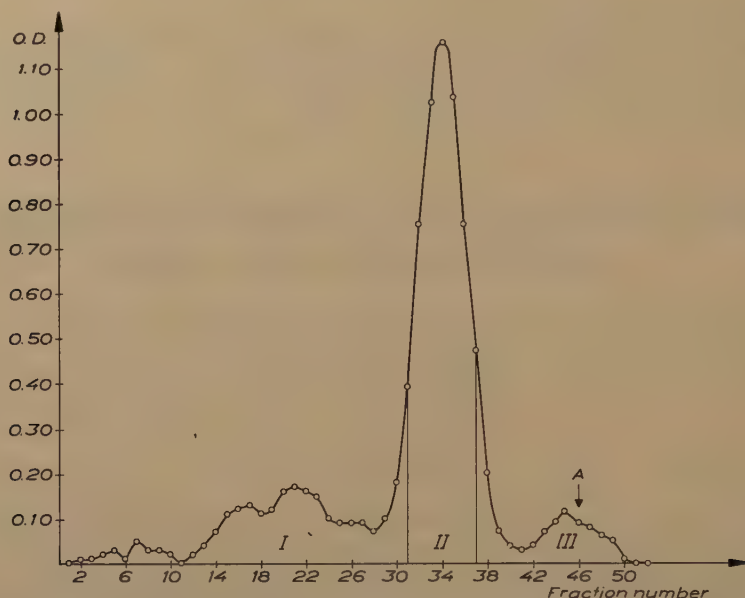


Fig. 1. Electropherogram of 60 mg of a β -MSH concentrate (350 I.U./mg). Column dimensions: 3.0 cm diam., 45 cm length; sample applied in 5 ml buffer solution; current 30 mA (175 V); time 72 hrs; fraction volume 4 ml; ninhydrin curve obtained on 0.2 ml aliquots. The arrow at A indicates the position of the starting zone. The anode direction corresponds to increasing displacement volumes.

proposed for the active principle. At present MSH (melanocyte-stimulating hormone) seems to be the most generally adopted name. When it was shown by Lee and Lerner (16) in 1956 that both reported forms of the porcine MSH were really present in the pituitary glands, they proposed to name the polypeptide originally isolated by them α -MSH and the peptide isolated by the other groups of investigators β -MSH. This latter name is used in this paper for the substance studied by the author.

Biological assay

All methods used to assay melanocyte-stimulating activity are based upon the property of the hormone to expand the melanophores in amphibia and fish. References to different proposed methods can be found in the review by Li (24).

The purification work in this laboratory of pig β -MSH was accompanied by assays performed by Professor Landgrebe and Dr. Mitchell in Cardiff. As test animals they used the South African frog *Xenopus laevis* and measured the melanophore-expanding activity by microscopic determination of the melanophore index of Hogben and Slome (26). The method, giving an accuracy of $\pm 10\%$ against a standard, has been described in detail by Landgrebe and Waring (27).

As yet there is no established international standard unit of melanocyte activity. Landgrebe used as reference standard the officially accepted international reference standard for pressor, oxytocic and antidiuretic activity. Using this standard, one international unit (I.U.) of MSH is the amount of activity present in 0.5 mg of the standard, determined by *in vivo* assay.

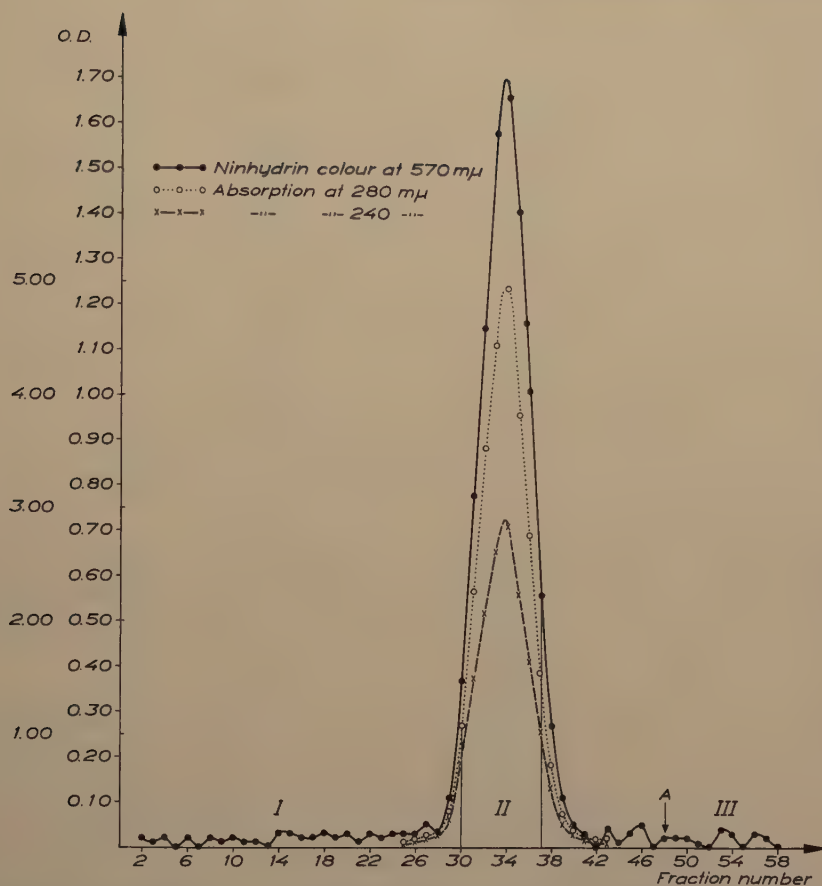


Fig. 2. Electropherogram of 39 mg β -MSH with a potency of 950 I.U./mg. (Refractionation of material obtained from two runs performed as described in Fig. 1.) The run was made on the same column and under the same conditions as given above except for the time which was 96 hrs.

Purification and isolation of β -MSH

The starting material was acetone-dried pig posterior pituitary powder with an average potency of 1.5 I.U./mg. Concentration of the activity, followed by a double fractionation of the concentrate by zone-electrophoresis in a cellulose powder column (0.1 M pyridinium acetate buffer, pH 4.9) permitted the isolation of a pure hormone, possessing an activity of 1500 I.U./mg (1). Figs. 1 and 2 illustrate the distribution of ninhydrin positive material (at 570 mμ) obtained by such a double fractionation. In Fig. 2 are also shown the ultraviolet absorption curves at 240 and 280 mμ, which coincide perfectly with the ninhydrin peak. Table 1 summarizes the yields and activities obtained in the runs illustrated.

When these electrophoretic runs were performed (in 1955) the only column size available was that mentioned above (3×45 cm). Since then, however, Porath has developed the zone-electrophoretic technique and constructed new and better apparatus. (A summary of this work has recently been published (28).)

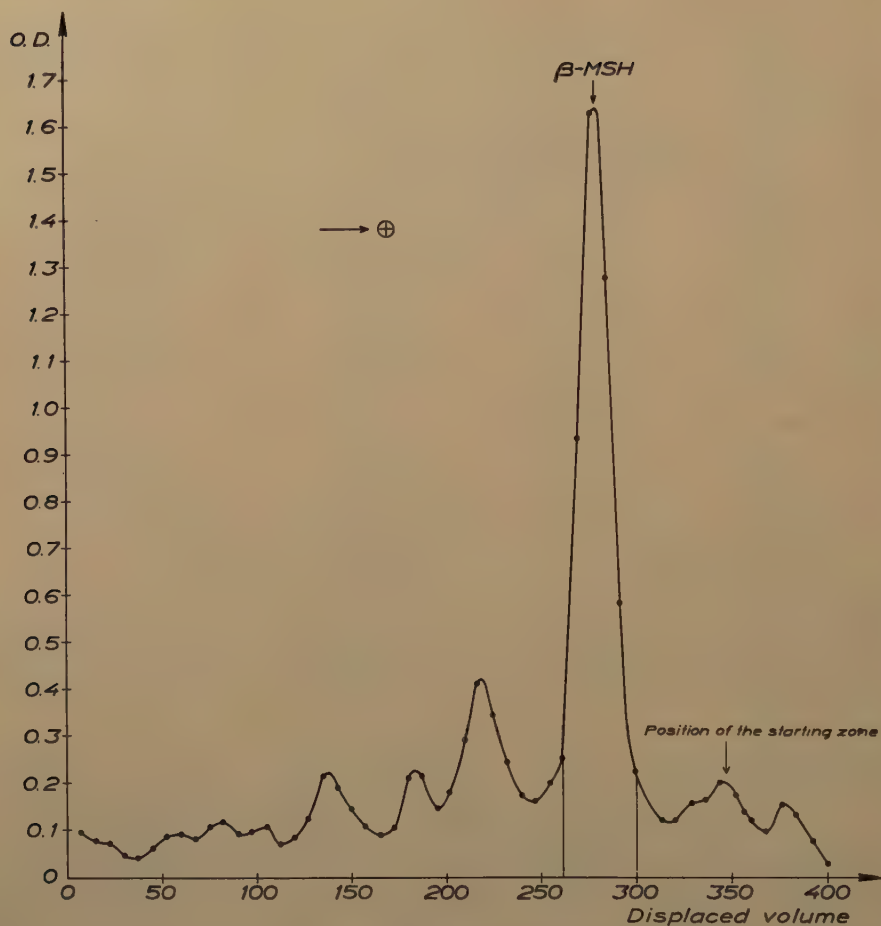


Fig. 3. Electropherogram of 122 mg of a β -MSH concentrate (350 I.U./mg) in 0.1 *N* pyridinium acetate, pH 4.9. Column dimensions: 2.0 cm diam., 150 cm length; sample applied in 10 ml buffer solution; current 52 mA; time 50 hrs; fraction volume 7.5 ml; ninhydrin curve on 0.2 ml aliquots. The direction to the anode is indicated by the symbol $\rightarrow \oplus$.

Table 1. Yields and activities obtained by an electrophoretic double fractionation of a β -MSH concentrate (1).

	Starting material		Recovery in "fraction II"		Recovered activity in "fraction II"
	mg	I.U./mg	mg	I.U./mg	%
Run 1 (see Fig. 1)	60	350	18	950	~ 80
Run 2 (material of the purity 950 I.U./mg was rerun; see Fig. 2)	39	950	25	1500	~ 100

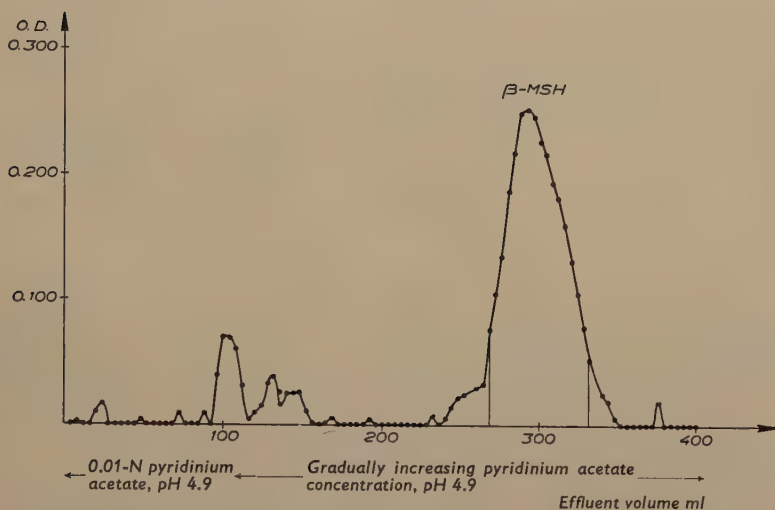


Fig. 4. Chromatogram obtained from a run of 10 mg of a highly purified β -MSH on SM-cellulose. The chromatogram was developed by 75 ml 0.01 *N* pyridinium acetate, pH 4.9, followed by a concentration gradient of the same buffer. When the gradient was started the mixing chamber (500 ml) was filled with 0.01 *N* buffer solution and was then feeded with 0.1 *N* buffer at a rate of 24 ml per hour. Column dimensions: 1.4 cm diam., 18 cm length; sample applied in 1 ml water; fraction volume 4 ml; ninhydrin curve on 0.25 ml aliquots.

Fig. 3 shows the ninhydrin curve obtained from a fractionation of a β -MSH concentrate (350 I.U./mg) in one of these new columns (2×150 cm). A comparison with Fig. 1 demonstrates that a much better resolution of the material was obtained in the longer column. The hormone recovered in the main peak (Fig. 3) had, within the range of the test method, the same activity (1500 I.U./mg) as that recovered from a double fractionation in the short column. Checking its purity by two-dimensional paper chromatography of an acid hydrolysate revealed, however, the presence of small amounts of the amino acids alanine, valine and leucine, which were not present in the pure material. The chromatogram was run according to Levy and Chung (29) and the paper was heavily overloaded (1.2 mg hormone) in order to detect minute amounts of foreign amino acids. β -MSH free of contaminant material was obtained either by a repeated zone-electrophoresis or by a gradient elution on sulfomethyl cellulose (SM-cellulose). Fig. 4 is the ninhydrin curve from such a run (10 mg β -MSH) on SM-cellulose in its free form. The buffer gradient was in principle made as described by Drake (30), using a mixing chamber of constant volume. The sample was dissolved in water and applied to the column, containing the ion exchanger in water. The recovery was 7.5 mg (the fractions were pooled as indicated in Fig. 4).

Composition of β -MSH

The amino acid composition of β -MSH was determined (2) by chromatography of acid hydrolysates on Dowex 50 columns, according to the methods of Moore and Stein (31, 32). Tryptophan was determined by a spectrophotometric method (33). No amide nitrogen was detected, using the Conway microdiffusion technique

(34). β -MSH was shown to be an octadecapeptide containing the following amino acid residues:

Asp₂, Glu₂, Gly₂, Ser, Met, Pro₃, Phe, Tyr, Try, His, Lys₂, Arg.

Geschwind *et al.* (12, 14) have obtained the same result, when studying the composition of their β -MSH by the DNP-paper method of Levy (35).

Structure of β -MSH

The complete amino acid sequence of β -MSH was determined (3, 4) by application of the Edman (36, 37) and carboxypeptidase methods (38) of stepwise degradation to the intact octadecapeptide and to peptide fragments derived from it. The fragments were produced by selective degradation of β -MSH with trypsin and chymotrypsin and isolated by high voltage electrophoresis on paper.

The sequence deduced in this manner was subsequently confirmed by means of partial acid hydrolysis and end-group analysis according to the methods developed by Sanger and his co-workers for their structural studies on insulin (39). The amino acid sequence thus established was as follows:

Asp.	Glu.	Gly.	Pro.	Tyr.	Lys.	Met.	Glu.	His.	Phe.	Arg.	Try.	Gly.	Ser.	Pro.	Pro.	Lys.	Asp.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Trypsin and chymotrypsin were found to hydrolyse β -MSH in accordance with their known specificities with the exception of the Lys.Asu linkage (positions 17-18). This bond was not attacked by trypsin, probably depending on inhibition by the negatively charged β -carboxyl group of the C-terminal aspartic acid. By varying the time of hydrolysis it was shown that the Arg.Try linkage (positions 11-12) had a higher rate of hydrolysis by trypsin than the Lys.Met linkage (positions 6-7). By chymotrypsin the order of hydrolytic rates was the following: the Phe.Arg linkage > the Tyr.Lys linkage > the Try.Gly linkage (positions 10-11, 5-6 and 12-13 respectively).

Biological assays for MSH activity performed on aliquots from these tryptic and chymotryptic digests were in all cases negative. It may be significant to note here, that the previously mentioned heptapeptide sequence (positions 7-13) present in both ACTH and β -MSH did not occur intact in any of the digests assayed.

The action of pepsin and subtilisin on β -MSH

The action of the relatively unspecific enzymes pepsin and subtilisin on β -MSH has been studied (5). The enzyme digests were submitted to electrophoresis and chromatography on paper and the mainly occurring peptide fragments were isolated. The degradation products were examined for constituent amino acids and subjected to end-group analysis and in this manner the major sites of action of the two enzymes were established.

The most sensitive bond in β -MSH to the attack of pepsin was the His.Phe linkage (positions 9-10) followed by the Phe.Arg linkage (positions 10-11). Subtilisin showed its highest affinity for the Tyr.Lys, Met.Glu and Phe.Arg linkages

(positions 5-6, 7-8 and 10-11, respectively) which were hydrolysed at approximately the same rate, and both enzymes thus split in "the common heptapeptide sequence" (positions 7-13). None of the digests was biologically active when tested in frogs. These findings are in agreement with the hypothesis put forward that the intact heptapeptide sequence is the necessary (but perhaps not sufficient) requisite for melanocyte-stimulating activity.

SUMMARY

1. A melanocyte-stimulating hormone (β -MSH) has been isolated from pig pituitary glands (1). The isolation, from a previously described concentrate, was achieved either by zone-electrophoresis alone (1) or by zone-electrophoresis in combination with chromatography on sulfomethyl cellulose.
2. The hormone has been shown to be composed of 18 amino acid residues (2).
3. The complete amino acid sequence of β -MSH has been elucidated (3, 4). It was found to contain a sequence of seven amino acids, which also occurs in the corticotropins. This observation and the intrinsic melanocyte-stimulating activity of the corticotropins strongly suggest a possible chemical basis for the action of the hormone.
4. The action on β -MSH of some proteolytic enzymes has been studied (4, 5).

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank Professor A. Tiselius for his kind interest in this work. The author is also indebted to Dr. J. Porath for stimulating discussions.

This work has been financially supported by grants to the Institute of Biochemistry from the Swedish Natural Science Research Council, from Stiftelsen Lars Hiertas Minne, and from the Rockefeller and Wallenberg Foundations.

Institute of Biochemistry, Uppsala, Sweden.

REFERENCES

1. PORATH, J., ROOS, P., LANDGREBE, F. W., and MITCHELL, G. M., *Biochim. et Biophys. Acta* **17** (1955), 598.
2. ROOS, P., *Acta Chem. Scand.* **10** (1956), 1061.
3. HARRIS, J. I., and ROOS, P., *Nature* **178** (1956), 90.
4. HARRIS, J. I., and ROOS, P., *Biochem. J.*, London. To be published.
5. HARRIS, J. I., and ROOS, P., *Biochem. J.*, London. To be published.
6. VAN DYKE, H. B., *The Physiology and Pharmacology of the Pituitary Body*, Vol. I. Univ. Chicago Press (1936), p. 315.
7. VAN DYKE, H. B., *Ibid.*, Vol. II (1939), p. 255.
8. WARING, H., and LANDGREBE, F. W., *Hormones*, Vol. II (1950).
9. LANDGREBE, F. W., KETTERER, B., and WARING, H., *Hormones*, Vol. III (1955).
10. LERNER, A. B., and LEE, T. H., *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955), 1066.
11. BENFEY, B. J., and PURVIS, J. L., *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955), 5167.
12. GESCHWIND, I. I., LI, C. H., and BARNAFI, L., *J. Am. Chem. Soc.* **78** (1956), 4494.
13. GESCHWIND, I. I., LI, C. H., and BARNAFI, L., *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957), 1003.
14. GESCHWIND, I. I., and LI, C. H., *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957), 615.
15. GESCHWIND, I. I., LI, C. H., and BARNAFI, L., *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957), 620.
16. LEE, T. H., and LERNER, A. B., *J. Biol. Chem.* **221** (1956), 943.
17. HARRIS, J. I., and LERNER, A. B., *Nature* **179** (1957), 1346.
18. BELL, P. H., *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954), 5565.
19. WHITE, W. F., and LANDMAN, W. H., *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955), 1711.

PAUL ROOS, *A melanocyte-stimulating hormone*

20. LI, C. H., GESCHWIND, I. I., COLE, R. D., RAACKE, I. D., HARRIS, J. I., and DIXON, J. S., *Nature* 176 (1955), 687.
21. DIXON, H. B. F., *Biochim. et Biophys. Acta* 19 (1956), 392.
22. BELL, P. H., *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956), 5051.
23. DIXON, H. B. F., *Biochem. J., London* 62 (1956), 25 P.
24. LI, C. H., In *Adv. in Proteins*, Vol. XII (1957).
25. ZONDEK, B., and KROHN, H., *Klin. Wochschr.* 11 (1932), 405.
26. HOGBEN, L. T., and SLOME, D., *Proc. Roy. Soc. B* 103 (1931), 10.
27. LANDGREBE, F. W., and WARING, H., in *Hormone Assay* (C. W. EMMENS, ed.). New York, Academic Press (1950), p. 141.
28. PORATH, J., Thesis, Uppsala, 1957.
29. LEVY, A. L., and CHUNG, D., *Anal. Chem.* 25 (1953), 396.
30. DRAKE, B., *Arkiv Kemi* 8 (1955), p. 16, Case 1.
31. MOORE, S., and STEIN, W. H., *J. Biol. Chem.* 211 (1954), 893.
32. MOORE, S., and STEIN, W. H., *J. Biol. Chem.* 192 (1951), 663.
33. GOODWIN, T. W., and MORTON, R. A., *Biochem. J., London* 40 (1946), 628.
34. HIRS, C. H. W., STEIN, W. H., and MOORE, S., *J. Biol. Chem.* 211 (1954), 941.
35. LEVY, A. L., *Nature* 174 (1954), 126.
36. EDMAN, P., *Acta Chem. Scand.* 4 (1950), 283.
37. FRAENCKEL-CONRAT, H., *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954), 3607.
38. HARRIS, J. I., Symposium on Peptide Chemistry. *Chem. Soc. Spec. Pub.* 2 (1955), 71.
39. SANGER, F., *Currents in Biochemistry Research* (D. E. GREEN, ed.) (1956), p. 434. Interscience, New York.

Tryckt den 2 oktober 1958

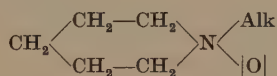
Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Zur Kenntnis der N-Oxyde

Von HANS VON EULER und HANS HASSELQUIST

Von den mannigfachen Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen, die als N-Oxyde bezeichnet werden, haben mehrere durch ihre biochemischen Wirkungen besonderes Interesse gewonnen. In konstitutions-chemischer und elektronenchemischer Hinsicht ist diese bemerkenswerte Klasse von Stoffen, auf deren Nomenklatur wir später zurückkommen, noch sehr unvollständig charakterisiert. Demgemäss ist es auch noch nicht gelungen, die Reaktionsfolge aufzuklären, die in vivo beim Übergang chemotherapeutisch aktiver N-Oxyde in ihre Wirkformen eintritt.

N-Oxyde nannten TH. ZINKE (1893) und E. WOHL (1901) die Produkte, die sie durch Einwirkung von Nitrobenzol und von trockenem NaOH auf Anilin bzw. β -Naphthylamin erhalten hatten. WERNICK schrieb 1896 die von MERLING entdeckte Alkyl-Piperidin-Verbindung



Alkyl-piperidin-Oxyd. N-Oxyd nannte auch E. BAMBERGER (1) das von ihm dargestellte Oxydationsprodukt des Dimethylanilins.

H. WIELAND stellte mit ST. GAMBARJAN (2) durch Oxydation von Diphenylamin das Diphenyl-hydroxylamin dar, und hat mit OFFENBACHER (3) aus dem

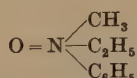
Hydroxylamin die Verbindung $\overline{\text{O}}\text{---N} \cdot \begin{array}{l} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ gewonnen. Er bezeichnete „den neuen

Körper als ‘Diphenyl-Stickstoff-Oxyd’, als eine prachtvoll krystallisierte, tiefrote Substanz, die ausserordentlich an das anorganische Vorbild, an NO_2 erinnert. Gleich dieser besitzt es ein charakteristisches *Bandenspektrum*, wie es ja auch für die Kohlenwasserstoffradikale kennzeichnend ist ... Aus angesäuerter verdünnter Jodkalium-Lösung macht Diphenylstickstoffoxyd in der Kälte sofort Jod frei ... Die Radikal-Natur der neuen Verbindung äussert sich, abgesehen von der ausserordentlichen Reaktionsfähigkeit gegenüber allen möglichen Agenzien und der Leichtigkeit, mit der sie mit anderen Radikalen sich vereinigt.“

Das Diphenylamin wird von allen Oxydationsmitteln rasch angegriffen. Die bekannte Farbenreaktion mit Salpetersäure und salpetriger Säure in konzentrierter Schwefelsäure führen WIELAND und GAMBARJAN darauf zurück, dass das Diphenylamin nach der ersten Reaktionsphase zum *Tetraphenylhydrazin* oxydiert wird.

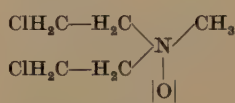
Eine neue Art von Asymmetrie beim Stickstoffatom hat J. MEISENHEIMER (4) nachgewiesen, u. zw. beim *Methyl-äthyl-anilin-oxyd*, das er durch Einwirkung von

Hydroperoxydlösung auf tertiäre Amine gewann und als eine Verbindung des 5-wertigen Stickstoffs, die eine Stickstoff-Sauerstoff Doppelbindung enthält, formulierte.

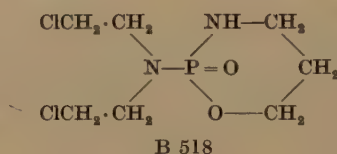


Indessen zog MEISENHEIMER auch ein O-Radikal in Betracht.

Den Aminoxyden entsprechen in ihrem Verhalten zu H_2O_2 die von E. OCHIAI u. Mitarb. (5) dargestellten N-Oxyde, die von japanischen Forschern, besonders von T. YOSHIDA und M. ISHIDATE (6), W. NAKAHARA (7), OKAMOTO (8), Y. SAKURAI (9) u. a., sodann von H. DRUCKREY (10), D. SCHMÄHL u. H. DRUCKREY (11) untersucht wurden, sowie die Verbindungen vom N-Lost Typus B 518 (Asta-Werke), H. ARNOLD, N. BROCK (12).



N-Lost-N-Oxyd
Nitromin Mitomen

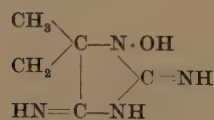


B 518

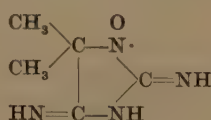
Im Anschluss an die Arbeiten von Wieland (2, 3) sei schon hier auf EUGEN MÜLLERS Formulierung der Diphenylamin-oxyde aufmerksam gemacht sowie auf seine bemerkenswerten magnetochemischen Ergebnisse (13). Das reaktive Verhalten freier Radikale, die zu den paramagnetischen Stoffen gehören, ist besonders wichtig für den oxydativen Stoffwechsel.

Zu einer Erweiterung des Begriffes Radikale, die man als Verbindungen mit unpaarer Elektronenzahl definiert, hat der Nachweis von Doppelradikalen geführt. Das magnetische Verhalten der einschlägigen Substanzen hat bei der Erforschung des Bindungszustandes von C-N-Biradikalen wichtige Erkenntnisse geliefert.

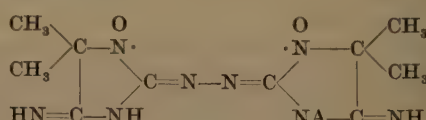
Ein N-Doppelradikal in der Reihe der Stickstoff-Verbindungen hat R. KUHN (14) in dem von O. PILOTY 1903 dargestellten *Porphyrindin* gefunden. Die tief indigoblaue Substanz ist im kristallisierten Zustand paramagnetisch. In magnetischer Hinsicht stellt das Porphyrindin ein organisches Analogon des Sauerstoffmoleküls O_2 dar, das gleichfalls 2 Magnetonen aufweist.



Porphyrexin (PILOTY)



Porphyrexid



Porphyrindin

Das dem halben Molekül des Porphyrindins nahe verwandte rote Radikal *Porphyrexid* wird oben zum Vergleich angeführt.

Darstellung neuer N-Oxyde

Wir haben zunächst die Zahl der Stoffe erweitert, die durch Einwirkung von Peroxyden auf Verbindungen 3-wertigen Stickstoffs entstehen, um ihre chemischen und biochemischen Eigenschaften vergleichend zu prüfen. Zu den früher von uns dargestellten *N-Oxyden* des 5,6-Dimethyl-chinoxalins, des 7,8-Dimethyl-5-Amino-chinolins, des Nicotinsäureamids, des Adenins und des wegen seiner biologischen Wirkungen und seiner Beziehung zu Globin, Glutaminsäure und Glutamin wichtigen Histidins kommen nun die N-Oxyde der folgenden Substanzen:

Nicotinsäure, Adenosin, ATP, Sulfapyridin, Sulfathiazol, Melamin, Porphyrexid, 2,2'-Pyridoin, 2,2'-Pyridil, 2,2'-Di-Pyridyl-glykol.¹

Zur Charakterisierung der neu dargestellten N-Oxyde wurde verwendet: Ihre Acidität, elektrometrisch sowie durch ihr elektrophoretisches Verhalten gemessen, ihre oxydo-reduktiven Eigenschaften, ihr Verhalten gegen aromatische Amine (Bildung von SCHIFFS Basen).

Nicotinsäure + Hydroperoxyd

2 g Nicotinsäure wurden zusammen mit 10 ml 30%iger Hydroperoxyd-Lösung in Eisessig 24 Stunden bei 70° erwärmt. Nach Eindampfen im Vakuum blieb eine farblose Kristallmasse zurück, die mit 20 ml Methanol aufgeköcht wurde. Die unlöslichen Kristalle wurden abfiltriert, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Durch Umkristallisieren in möglichst wenig siedendem Wasser wurden lange, farblose, gut ausgebildete Nadeln vom Schmp. 256° erhalten.

<i>Analyse.</i>	Ber. für $C_6H_5O_3N$	C 51,80 %	H 3,62 %	N 10,01 %
	Gef.	51,47	3,96	10,13

Die Substanz 284 erwies sich also als Nicotinsäure-N-oxyd. Sie ist schwerlöslich in Methanol, Benzol, Chloroform; ziemlich löslich in Wasser.

p-Phenanthrolin und Benzoeopersäure

p-Phenanthrolin wurde im wesentlichen nach dem Verfahren von A. KAUFMANN u. R. RADOŠEVIĆ (Ber. 42, 2613; 1909) aus 6-Amino-chinolin, Glycerin, Diarsen-pentoxyd und konz. Schwefelsäure durch Erwärmen auf 150°, 3 Stunden, dargestellt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser versetzt und alkalisiert und dann mit Chloroform extrahiert. Aus der getrockneten und eingedunsteten Chloroform-Lösung wurde das Produkt in Form farbloser Nadeln vom Schmp. 177° erhalten.

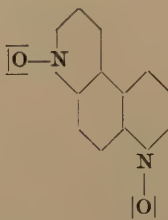
0,9 g des *p*-Phenanthrolins wurde mit einer Chloroform-Lösung von Benzoeopersäure (etwa das 10fachen der für die Bildung von Di-N-Oxid berechneten Menge) versetzt. Das Phenanthrolin löste sich mit gelber Farbe. Im Verlauf eines Tages schieden sich orangegelbe kompakte Kristalle vom Schmp. 279° aus. Schmp. durch Umkristallisieren aus Methanol unverändert.

<i>Analyse.</i>	Ber. für $C_{12}H_8N_2O_2$	C 67,92 %	H 3,80 %	N 13,20 %
	Gef.	67,50	4,06	13,26

¹ Wir verdanken diese Pyridin-Derivate Herrn Direktor Dr RASCHIG, Ludwigshafen/Rhein.

Die Zusammensetzung der Stbst. 280 stimmt also sehr gut auf das Bis-N-oxyd des *p*-Phenanthrolins.

Die Stbst. 280 ist ziemlich schwerlöslich in allen üblichen organischen Lösungsmitteln sowie in Wasser.



Sulfapyridin + Hydroperoxyd

1 g Sulfapyridin wurde mit 10 ml Eisessig und 5 ml 30%iger Hydroperoxyd-lösung auf 70° gehalten. Die Lösung färbte sich sofort gelb und nach etwa 10 Minuten begann das Ausfallen eines gelbbraunen Kristallpulvers. Nach 60 Min. war das Oxydationsprodukt ganz ausgefallen und konnte leicht abfiltriert werden. Es wurde gewaschen und getrocknet. 800 mg Rohprodukt schmolzen über 280°. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus viel Pyridin änderte sich der Schmp. nicht.

<i>Analyse.</i>	Ber. für. (C ₁₁ H ₁₀ N ₃ O ₃ S) ₂	C 53,30 %	H 4,03 %	N 16,90 %
Gef.		53,04	3,93	16,20

Die Stbst. 286 ist in allen üblichen organischen Lösungsmitteln sehr schwer löslich. Wenig löslich in siedendem Eisessig und Pyridin. Äusserst schwerlöslich in Wasser und Alkali, löslich in 5-n. HCl und konz. Schwefelsäure.

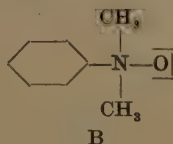
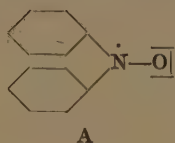
Sulfathiazol + Hydroperoxyd

250 mg Sulfathiazol in 5 ml Eisessig werden mit 2 ml 30%iger Hydroperoxyd-Lösung auf 70° erwärmt. Die Reaktionsmischung färbt sich schnell gelb, nach etwa 30 Min. scheiden sich kleine dunkelgelbe Kristalle ab. Nach 2 Stunden wurde von diesen abfiltriert; das mit Wasser gewaschene Rohprodukt schmolz über 200°.

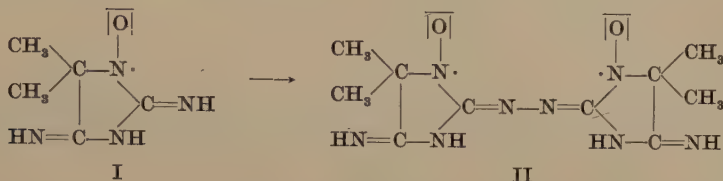
<i>Analyse.</i>	Ber. für C ₉ H ₆ N ₃ O ₃ S ₂	C 39,84 %	H 3,34 %	N 15,49 %	S 23,63 %
Gef.		40,96	3,48	15,01	22,68

Die Stbst. 286 ist in allen üblichen organischen Lösungsmitteln sehr schwer löslich, schwer löslich auch in Wasser.

Mit dem durch die bisher mitgeteilten synthetisierten Verbindungen erweiterten Material beginnen wir den Versuch, die verschiedenen Typen von „N-Oxyden“ gegeneinander abzugrenzen und zu charakterisieren. Wir haben zwei Haupt-Typen zu unterscheiden: den Radikal-Typ A (2) und den Nicht-Radikal-Typ B.



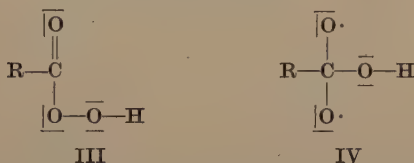
Zum Radikal-Typ A gehört auch das Porphyrexid I (14), das in das Di-Radikal Porphyrindin II übergeht:



Den obigen schon früher bekannten Substanzen entsprechen das stabile Radikal Triphenylhydrazyl (15) und das stabile Radikal 2,2-diphenyl-1-trinitrophenylhydrazyl (16, 17).



Wir reihen hier, noch ehe wir in eine diesbezügliche Diskussion eingehen, ein *Peroxyd* an, und zwar das Nicht-Radikal III.



Dessen Radikal-Form IV ist, wie schon hier betont sei, unwahrscheinlich, u. a. wegen der hohen Elektronenaffinität des Sauerstoffs.

Die Prüfung der neuen N-Oxyde im Keim-Test an Gerste und an Krasse ist noch nicht abgeschlossen. In Konzentrationen von 10 mg/30 ml (30 Gersten-Körner nach 6stündigem Quellen in Wasser mit 30 ml Lösung behandelt) zeigten Nikotinsäureamid-N-Oxyd sowie Nikotinsäure-N-oxyd keine Giftwirkung aber eine geringe Verkürzung der Wurzeln und eine Beschleunigung der Ausbildung der Coleoptile von etwa 20 %. Wir kommen auf die Beschreibung dieser Versuche an anderer Stelle zurück.

Herrn O. HEIDENBERGER danken wir für die Mitwirkung bei der Darstellung der N-Oxyde.

Stockholm, Universität, Institut für organ.-chem. Forschung.

LITERATURVERZEICHNIS

1. E. BAMBERGER u. F. TSCHIRNER, Ber. 32, 342 (1899).
2. H. WIELAND u. ST. GARBARJAN, Ber. 39, 1419 (1906).
3. H. WIELAND u. M. OFFENBACHER, Ber. 47, 2111 (1914).
4. J. MEISENHEIMER, Ber. 41, 3966 (1909).
5. E. OCHIAI u. Mitarb., J. Pharm. Soc. Japan 70, 372, 384, 385, 394 (1950). — E. HAYASHI, ebenda 71, 213 (1951). Siehe auch die Arbeiten über N-Oxyde aus der Landwirtsch. Hochsch, Wageningen und aus dem Pharmac. Institut, Warszawa.
6. T. YOSHIDA u. M. ISHIDATE, Gann 42, 171 (1953). — Proc. Imp. Acad. Japan 27, 493 (1951). — M. ISHIDATE, Symp. Chemother. of Cancer, Tokyo (1957).
7. W. NAKAHARA, F. FUKUOKA u. T. SUGIMURA, Gann 48, 129 (1957). — W. NAKAHARA, F. FUKUOKA u. S. SAKAI, Gann 49, 33 (1958).
8. T. OKAMOTO, J. Pharm. Soc. Japan 71, 297 (1951).
9. Y. SAKURAI u. Mitarb., Symp. Chemother. of Cancer, Tokyo 1957.
10. H. DRUCKREY, Dtsch. Med. Wochschr. 77, 1534 (1952). — Klin. Woch. 1952, 882. — H. DRUCKREY, D. SCHMÄHL u. W. DISCHLER, Dtsch. Med. Wochschr. 83, 489 (1958).
11. D. SCHMÄHL u. H. DRUCKREY, Naturwiss. 43, 199 (1956).
12. N. BROCK, Arzneim. Forsch. 7, 727 (1957); 8, 1 (1958). — H. ARNOLD, F. BORSEAUX u. N. BROCK, Naturwiss. 45 (1958). — N. BROCK u. N. WILMANN, Dtsch. Med. Wochschr. 83, 453 (1958).
13. E. MÜLLER, Neuere Anschauungen der organ. Chemie. Berlin, Springer, 1940. — E. MÜLLER, I. MÜLLER-RODLOFF u. W. BUNGE, Lieb. Ann. 520, 235 (1935). — E. MÜLLER u. I. MÜLLER-RODLOFF, Lieb. Ann. 521, 81 (1935).
14. RICH. KUHN, H. KATZ u. W. FRANKE, Naturwiss. 22, 808 (1935).
15. ST. GOLDSCHMIDT, Ber. 53, 44 (1920).
16. ST. GOLDSCHMIDT u. K. RENN, Ber. 55, 628 (1922).
17. I. A. LYONS u. W. P. WATSON, J. Polymer. Sci. 18, 141 (1955).

Tryckt den 2 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Resolution and configuration of 3-thienylglycolic acid

By SALO GRONOWITZ

With 7 figures in the text

In connection with work on optically active thiophene compounds, 3-thienylglycolic acid (1) has been resolved into its antipodes. The levorotatory form was obtained through fractional crystallization of the (+)-phenethylamine salt and the dextrorotatory form through fractional crystallization of the strychnine salt. Preliminary tests on resolution indicate that it should also be possible to use quinine and cinchonidine. In the preliminary experiment good resolution was obtained with (+)-phenethylamine. On a larger scale however the resolution was not so good indicating that the separation of the salt depends more on the rate of crystallization than on differences in solubility. Fredga (2) by making use of such a difference in crystallization rate was able to obtain both antipodes of α -ethylxanthogene phenylacetic acid through the quinine salts.

As the same maximum activity was obtained with both bases it is justifiable to assume that the acids having a m. p. 123.5–124° represent the optically pure antipodes of 3-thienylglycolic acid. The purity of the antipodes is also evident from the absence in their IR-spectra of the strong absorption bands at 7.27 μ and 12.70 μ characteristic for the racemate (Fig. 5 and Fig. 6 ref. (1)).

The 3-thienylglycolic acids are stable, well crystallizing compounds which are more like mandelic acid than the 2-isomers in appearance.

The configurations of the active 3-thienylglycolic acids were determined relative to mandelic acid through the Fredga method (3). The existence of a quasi-racemate between 3-thienylglycolic acid and mandelic acid with opposite directions of rotation could be demonstrated with melting-point diagrams, X-ray powder photographs (4) and IR-spectra (5). Fig. 1 shows that 3-thienylglycolic acid is a true racemate and its racemate forming tendency is of the same magnitude as that of mandelic acid. Fig. 2 clearly shows the existence of the quasi-racemate. The acids with the same direction of rotation form a solid solution (Fig. 3).

The X-ray powder photographs demonstrate the similarity of the quasi-racemate with racemic 3-thienylglycolic acid, as their powder photographs have a very similar line distribution (Fig. 4 a and b). The line distribution of the equimolar mixture of the acids with the same direction of rotation is very similar to active 3-thienylglycolic acid (Fig. 4 c and d). It thus seems in this case that the thiophene compound has a dominating influence on the crystal lattice. Usually it is the benzene compound (4, 6).

The IR-spectra in KBr phase give additional evidence for the existence of the quasi-racemate. The equimolar mixture of the acids with the same direction of

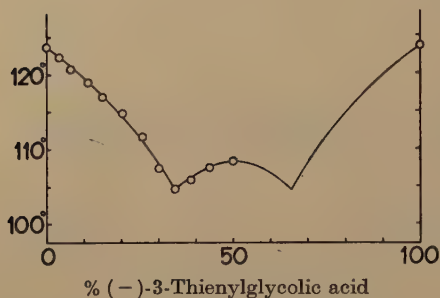


Fig. 1. (+)- and (-)-3-Thienylglycolic acid.

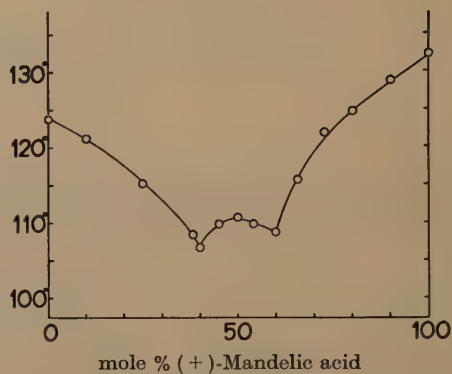


Fig. 2. (+)-Mandelic acid and (-)-3-thienylglycolic acid.

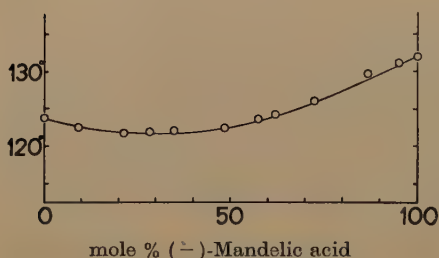


Fig. 3. (-)-Mandelic acid and (-)-3-thienylglycolic acid.

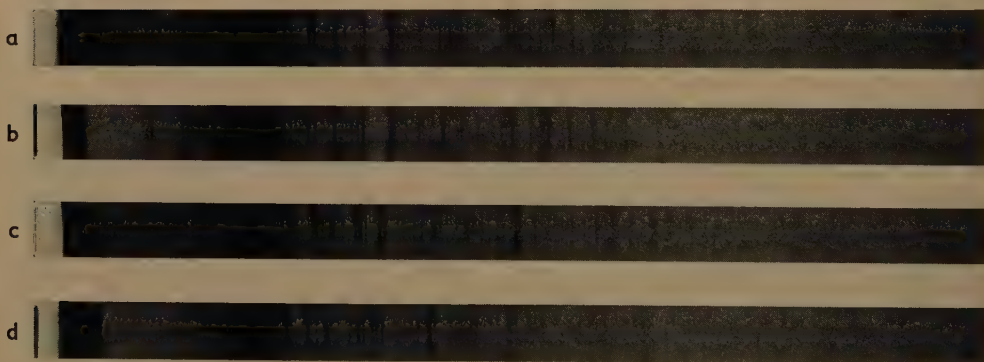


Fig. 4. (a) *rac*-3-Thienylglycolic acid. (b) Equimolar amounts of (+)-mandelic acid and (-)-3-thienylglycolic acid. (c) (-)-3-Thienylglycolic acid. (d) Equimolar amounts of (-)-mandelic acid and (-)-3-thienylglycolic acid.

rotation, is additively composed of the spectra of the components apart from some small differences (Fig. 6). The spectrum of the equimolar mixture of (-)-3-thienylglycolic acid and (+)-mandelic acid, however, shows appreciable differences (Fig. 7). It is interesting to note that the most marked difference is the appearance of absorption bands at 7.23μ and 12.70μ . Those bands, as mentioned

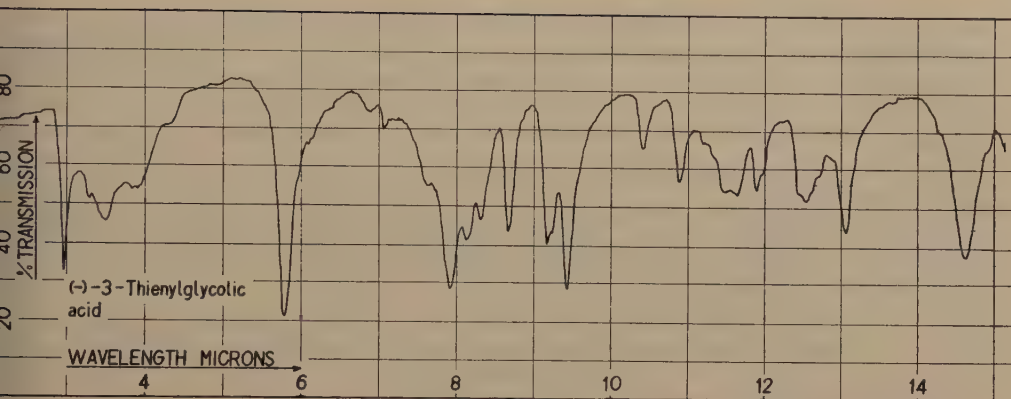


Fig. 5. IR-spectrum of (-)-3-thienylglycolic acid.

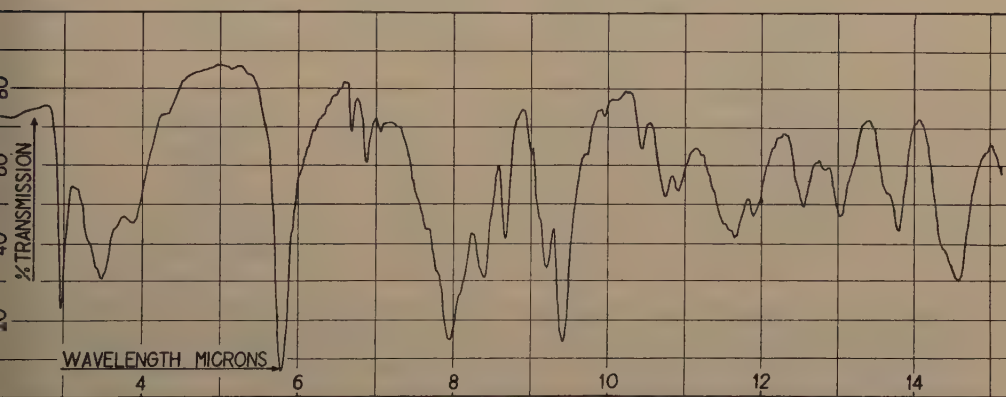


Fig. 6. IR-spectrum of equimolar amounts of (-)-mandelic acid and (-)-3-thienylglycolic acid.

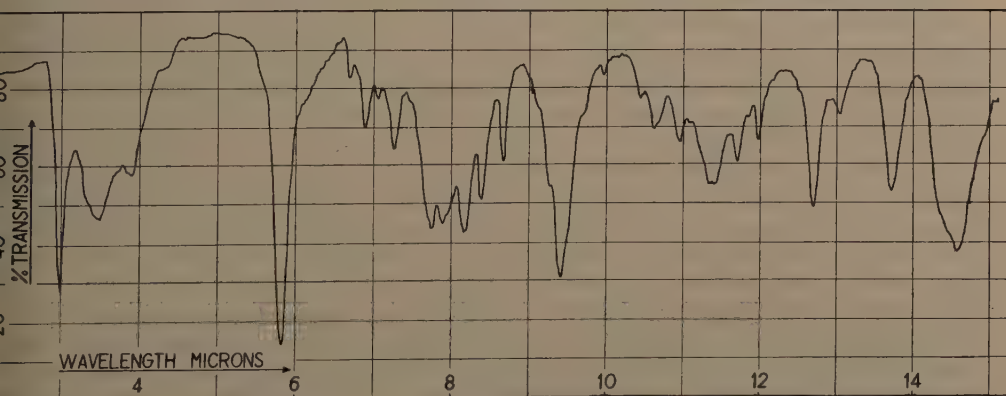


Fig. 7. IR-spectrum of equimolar amounts of (+)-mandelic acid and (-)-3-thienylglycolic acid.

above, constitute the characteristic differences of the IR-spectra of racemic and active 3-thienylglycolic acid and thus give evidence for the similarity between the quasi-racemate and the racemate. Other differences appear also in the fingerprint region. The IR-spectra of as well 2- as 3-thienylglycolic acid thus show marked differences between the racemate and the active forms. It is therefore rather curious that only small differences exist in the spectra of racemic and active mandelic acid.

The optical rotation of 3-thienylglycolic acid in different solvents also shows a marked parallelism with those of mandelic acid and 2-thienylglycolic acid (7) in the same solvents.

Table 1. Optical activity of the isomeric thienylglycolic acids and mandelic acid.

Solvent	$[\text{M}]_D^{25}$ of acid		
	(+)-2-thienylglycolic acid	(+)-3-thienylglycolic acid	(+)-mandelic acid
Acetic acid	+ 172°	+ 198°	+ 269°
Water	+ 158°	+ 192°	+ 232°
Ethanol	+ 140°	+ 162°	+ 228°
Acetone	+ 135°	+ 161°	+ 225°
Ethyl acetate	+ 135°	+ 157°	+ 237°
Ether	+ 112°	+ 134°	+ 212°
Water (ion)	+ 91°	+ 152°	+ 179°

The results obtained establish that 3-thienylglycolic acid and mandelic acid with the same mode of rotation also have the same configuration. Mandelic acid has recently been connected to 2-thienylglycolic acid through 'quasi-racemate' (7) and the latter acid connected to α -hydroxycaproic acid through Raney-nickel desulphurization. (–)-3-Thienylglycolic acid thus belongs to the D-series of α -hydroxy acids.

The relation between structure and the rate of base-catalyzed racemization and other prototropic reactions (8, 9) is well understood. It has been found that electron-attracting substituents which facilitate the dissociation of a proton at the asymmetric carbon increase the rate of racemization. Extensive discussions of the mechanisms of racemization have been given by Wheland (10), Hückel (11), Wagner-Jauregg (12) and Gilman (13).

In order to study the electron-attracting properties of the 2- and 3-thienyl groups as compared to the phenyl group, the rate of the base catalyzed racemization of the isomeric thienylglycolic acids and mandelic acid has been measured. The racemization of mandelic acid has earlier been investigated by Winther (14), Rothe (15), McKenzie and Wren (16) and by Campbell and Campbell (17).

Preliminary experiments showed that at 90° and at a concentration of 0.2-N sodium hydroxide the racemization of 2-thienylglycolic acid was slow enough and those of 3-thienylglycolic acid and mandelic acid rapid enough to be conveniently measured. It was found that 2-thienylglycolic acid was racemized about 33 times faster than mandelic acid and 20 times faster than the 3-isomer.

The monomolecular rate constants were calculated according to the usual formula (13)

$$k = \frac{2.303}{2 \cdot t} \cdot \log_{10} \frac{\alpha_0}{\alpha_t}$$

The rate constants obtained for mandelic acid, 3-thienylglycolic acid and 2-thienylglycolic acid are thus 0.00014 min^{-1} , 0.00023 min^{-1} and 0.0046 min^{-1} respectively, clearly showing that the electron-attracting properties of the 2-thienyl group are much stronger than those of the phenyl and 3-thienyl groups. The present author, however is aware of the possibility that racemization according to the Werner mechanism might give small contributions to the racemization (18). (However c. f. (11)).

Experimental

Preliminary tests on resolution were made with 0.005 moles of acid and 0.005 moles of base in dilute alcohol or ethyl acetate. The results are given below.

Base	[α] _D ²⁵ of acid in ethanol	
	From water	From ethyl acetate
Brucine	s	
Strychnine	+ 36°	
Cinchonine	+ 0°	
Cinchonidine	- 25°	
Quinine	+ 89°	
Quinidine	oil	
(-)- α -Phenylethylamine	$\pm 0^\circ$	+ 72°
(+)-Benzedrine	$\pm 0^\circ$	$\pm 0^\circ$
(+)- α -Naphthylethylamine	$\pm 0^\circ$	$\pm 0^\circ$

Optical resolution of 3-thienylglycolic acid

20.0 g (0.126 moles) of 3-thienylglycolic acid and 15.3 g (0.126 moles) (+)- α -phenylethylamine were dissolved in a hot mixture of 500 ml ethyl acetate and 225 ml of methanol. The crystals which separated on cooling were filtered off. About 0.3 g of the salt was set apart, the acid isolated and the optical activity measured in ethanol. The remaining salt was recrystallized from ethyl acetate-methanol mixtures, and the process repeated until the optical activity of the acid remained constant. The course of the resolution is seen below.

Crystallization	1	2	3	4	5	6
g salt	12.5	8.0	4.5	2.9	2.0	1.4
ml ethyl acetate	500	400	160	100	75	50
ml methanol	225	160	20	20	15	10
[α] _D ²⁵ of acid	- 10°	- 41°	- 77°	- 100°	- 101°	- 101°

The mother liquor from the first crystallization with (+)-phenylethylamine was evaporated in vacuo and 22.5 g of salt was obtained. This salt yielded 12.1 g

S. GRONOWITZ, *Resolution and configuration of 3-thienylglycolic acid*

(0.0764 moles) of 3-thienylglycolic acid having $[\alpha]_D^{25} = +7^\circ$. This acid was dissolved together with 25.5 g (0.0764 moles) of strychnine in 600 ml water. The salt crystallized over night. The progress of resolution is seen below.

Crystallization	1	2	3	4	5	6
g salt	21	12.5	7.2	5.3	4.4	3.4
ml water	600	400	200	90	70	60
$[\alpha]_D^{25}$ of acid	+40°	+71°	+95°	+100°	+101°	+101°

(-)-3-Thienylglycolic acid

The (+)-phenylethylamine salt (1.2 g) was decomposed with 1-N sulphuric acid and the active acid extracted 20 times with ether. The ether was removed in vacuo and the acid recrystallized from 75 ml of benzene, yielding 0.62 g of pure acid, m. p. 123.5–124°, crystallizing in white flakes.

0.08536 g acid: 5.36 ml 0.1014-N NaOH

$C_6H_5O_3S$ (158.2). Equiv. wt. calc. 158.2, found 157.0

0.10724 g made up to 20.00 ml with ethanol: $2\alpha_D^{25} = -1.095^\circ$;

$[\alpha]_D^{25} = -102.1^\circ$, $[M]_D^{25} = -161.5^\circ$.

(+)-3-Thienylglycolic acid

3.0 g of the strychnine salt was treated with 1-N sodium hydroxide and the strychnine rapidly extracted four times with chloroform. The aqueous phase was at once acidified with 1-N sulphuric acid and worked up in the same manner as above. After one recrystallization from benzene, 0.88 g of pure acid m. p. 123.5–124° was obtained.

0.09752 g acid: 6.07 ml 0.1014-N NaOH

$C_6H_5O_3S$ (158.2). Equiv. wt. calc. 158.2, found 158.4

Weighed amounts of acid were made up to 20.00 ml with different solvents and the optical activity measured.

Table 2. Optical activity of (+)-3-thienylglycolic acid in different solvents.

Solvent	mg of acid	$2\alpha_D^{25}$	$[\alpha]_D^{25}$	$[M]_D^{25}$
Acetic acid	83.80	+1.049°	+125.2°	+198.1°
Water	107.50	+1.306°	+121.5°	+192.2°
Ethanol	78.43	+0.804°	+102.5°	+162.2°
Acetone	93.11	+0.946°	+101.6°	+160.7°
Ethyl acetate	112.65	+1.121°	+99.5°	+157.4°
Ether	99.32	+0.839°	+84.5°	+133.7°
Water (ion)	118.07	+1.134°	+84.3°	+151.9°

The optical rotation of 0.10750 g of (+)-3-thienylglycolic acid in 20 ml of water was measured at different wavelengths. The results are given in Table 3.

Racemization experiments

To weighed amounts of the acids the calculated amounts of 1.000-N sodium hydroxide solution was added and then diluted to 25.0 or 50.0 ml with water.

Table 3. Rotation dispersion of (+)-3-thienylglycolic acid.

Wavelength, Å	$2\alpha^{25}$	$[\alpha]^{25}$
6438	+1.084°	+100.8°
5893	+1.306°	+121.5°
5461	+1.575°	+146.5°
5086	+1.890°	+175.8°

After the rotation had been measured at 25° at 5086 Å (green Cd-line) in a 0.5 dm tube, about 5 ml aliquots of the solutions were melted into ampoules and placed in the thermostat at 90.1°. At fixed times the ampoules were taken from the thermostat and rapidly cooled and then thermostated at 25° and the rotation measured in the same manner as for the zero-time-solution. The thermostat used was a Bühler superthermostat of the Höppler type. The temperature constancy in the measurements was better than 0.1°.

To 1.2548 g of (+)-mandelic acid, 18.24 ml 1.000-N NaOH was added and the solution made up to 50 ml. The solution is thus 0.165-N in sodium mandelate and 0.200-N in sodium hydroxide.

<i>t</i> , min.	0	198	430	680	1397	1781	2146
$0.5\alpha_{5086}^{25}$	+2.151°	+2.014°	+1.895°	+1.762°	+1.463°	+1.320°	+1.208°
1000 <i>k</i> , min ⁻¹	—	0.166	0.147	0.147	0.138	0.137	0.134

$k = 0.00014 \text{ min}^{-1}$.

To 0.5933 g (–)-2-thienylglycolic acid, 8.75 ml 1.000-N sodium hydroxide was added and the solution was made up to 25.0 ml. The solution is thus 0.150-N in sodium 2-thienylglycolate and 0.200-N in sodium hydroxide.

<i>t</i> , min.	0	25	50	70	90	135
$0.5\alpha_{5086}^{25}$	–0.989°	–0.777°	–0.629°	–0.523°	–0.436°	–0.284°
1000 <i>k</i> , min ⁻¹	—	4.83	4.53	4.55	4.55	4.62

$k = 0.0046 \text{ min}^{-1}$.

To 0.6146 g (+)-3-thienylglycolic acid, 8.88 ml 1.000-N sodium hydroxide was added and the solution made up to 25.0 ml. The solution is thus 0.155-N in sodium 3-thienylglycolate and 0.200-N in sodium hydroxide.

<i>t</i> , min.	0	210	472	744	1097	1550
$0.5\alpha_{5086}^{15}$	+1.696°	+1.526°	+1.360°	+1.212°	+1.083°	+0.881°
1000 <i>k</i> , min ⁻¹	—	0.252	0.234	0.226	0.204	0.211

$k = 0.00023 \text{ min}^{-1}$.

Optical activities, melting-points, X-ray powder photographs and IR-spectra were determined as described earlier (4, 6).

SUMMARY

3-Thienylglycolic acid has been resolved into its antipodes. Its steric relationship to mandelic acid has been established by the quasi-racemate method. The existence of a quasi-racemate between the components of opposite mode of rotation was demonstrated through melting-point diagrams, X-ray powder photographs and IR-spectra in KBr phase.

S. GRONOWITZ, *Resolution and configuration of 3-thienylglycolic acid*

The base catalyzed racemization of the isomeric thienylglycolic acids and mandelic acid has been investigated at $+90^{\circ}$ C. It was found that 2-thienylglycolic acid is racemized 20 times faster than the 3-isomer and 33 times faster than mandelic acid. This gives strong evidence for the greater electron-attracting properties of the 2-thienyl group as compared to the 3-thienyl and phenyl groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Professor Arne Fredga for valuable discussions and for kindly placing the antipodes of mandelic acid at his disposal. Thanks are also due to the head of this institute Professor Nils Hellström for his kind interest and for all facilities put at the author's disposal. Thanks are also due to Dr. Sixten Abrahamsson for taking the X-ray powder photographs and for his expert advice in connection with them and to Mr. Stig Bergvall for taking the IR-spectra.

Institute of Organic Chemistry, Royal Agricultural College, August 1958.

REFERENCES

1. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* **11**, 519 (1957).
2. FREDGA, A., *Arkiv Kemi, Miner. Geol.* **24** B n:o 15 (1947).
3. FREDGA, A., "The Svedberg 1884 30/8 1944", Uppsala 1944, p. 261.
4. GRONOWITZ, S. and LARSSON, S., *Arkiv Kemi* **8**, 567 (1955).
5. ROSENBERG, A. and SCHOTTE, L., *Arkiv Kemi* **8**, 143 (1955).
6. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* **11**, 361 (1957).
7. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* **13**, 87 (1958).
8. DEWAR, M. J. S., *Electronic theory of organic chemistry*. Oxford 1952, pp. 97-100.
9. INGOLD, C. K., *Structure and mechanism in Organic Chemistry*. London 1953, pp. 530-75.
10. WHELAND, G. W., *Advanced Organic Chemistry*. New York 1949, pp. 250-261.
11. HÜCKEL, W., *Theoretische Grundlagen der organischen Chemie*. Leipzig 1956, pp. 456-475.
12. WAGNER-JAUREGG, in *Freudenberg's Stereochemie*, Leipzig and Wien 1933, pp. 852-869.
13. GILMAN, H., *Organic Chemistry*, Vol. I. New York 1948, pp. 241-248.
14. WINTER, C., *Z. phys. Chem.* **56**, 465 (1906).
15. ROTHE, O., *Ber.* **47**, 843 (1914).
16. MCKENZIE, A. and WREN, H., *J. Chem. Soc.* **115**, 609 (1919).
17. CAMPBELL, A. N. and CAMPBELL, A. J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 4581 (1932).
18. ERLÉNMEYER, H., SCHENKEL, H., and EPPRECHT, A., *Helv. chim. acta* **9**, 1053 (1936).

Tryckt den 22 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

UV-spectra of monosubstituted thiophenes

By SALO GRONOWITZ

With 4 figures in the text

The interpretation of the benzene spectrum in the near-ultraviolet region accepted today seems to be that the band in the 2000 Å region referred to as the *E*-band (or *K*-band by some authors) can be ascribed to a transition from an essentially homopolar ground state to a dipolar excited state. The low intensity B-bands at 2500 Å are ascribed to a forbidden transition involving increased contributions of homopolar Dewar structures in the excited state, and the low intensity band R-band at 2800 Å is assumed to be connected with an excited biradical state of double-bonded molecules (1). When the phenyl group is in conjugation with another chromophore a new high-intensity band (*K*-band) occurs in the 2300–2600 Å region which depends upon the increased conjugation which decreases the energy of the excited state. With this knowledge of the structure of the excited states it has been possible to discuss the influence of substituents on the ground and excited states of benzene derivatives and obtain useful correlation between UV-absorption spectra and the structure of the compounds (2).

The interpretation of the spectrum of thiophene and also of furan and pyrrole are however still very uncertain and incomplete. The most recent analysis of the UV-spectrum of thiophene in the *gaseous* state has been given by Milazzo (3) where also complete references to earlier work can be found. According to Milazzo the bands in the 2000–2600 Å region can be ascribed to two or three different electronic transitions. The A-(O)–B-(O) transition occurs at $41\,595\text{ cm}^{-1}$ (2405 Å) and it is possible that a second transition A–B' occurs at $42\,992\text{ cm}^{-1}$ (2326 Å). This transition is only partially forbidden in thiophene contrary to the corresponding benzene transition, and the molar extinction coefficient of thiophene is about 7000 at $235\text{ m}\mu$ compared with $\epsilon=220\text{--}250$ of the $250\text{ m}\mu$ bands in benzene. Another transition occurs A-(O)–C-(O) at $45\,378\text{ cm}^{-1}$ (2204 Å). According to Milazzo the A–C transition about $220\text{ m}\mu$ in the thiophene is similar in nature to the $203.5\text{ m}\mu$ absorption in benzene, and the A–B transitions in the $230\text{--}240\text{ m}\mu$ region to the B-band of benzene. In a later paper, however, Milazzo (4) suggests that the absorption in the $220\text{ m}\mu$ region is due to excitation of one of the p-electrons left at the sulphur. This is not unlikely, since in aliphatic sulphides as in dimethyl sulphide, absorption occurs at $210\text{ m}\mu$ ($\epsilon=2600$) (5).

The spectrum of thiophene *in solution* has been recorded by several authors (6, 7, 8, 9). It has a broad absorption band with few special features: λ_{max} occurs at $231\text{ m}\mu$ and $235\text{ m}\mu$ ($\log \epsilon=3.87$ and 3.85) and there are two inflexions at

242 $m\mu$ and 215 $m\mu$. The inflexion at 215 $m\mu$ is especially important as it apparently corresponds to the A-C transition found in the vapour phase by Milazzo (3).

The above mentioned conditions make an analysis of the effect of substituents in thiophene on the UV-spectrum more difficult than in the benzene series. In benzene there are two widely separated areas of absorption with different intensity. In thiophene we have two or three absorption bands due to electronic transitions which overlap and are of similar intensity. The situation in furan on the other hand is similar to that of benzene. Only one high intensity band occurs about 200 $m\mu$.

Only scattered information is available on the UV-spectra of substituted thiophenes. A review of results obtained before 1949 is given by Hartough (9). Szmant and Basso (10) have investigated seventeen 2-thienylketones and also Campaigne and Dietrich (11), Boig *et al.* (12) and Sicé (13) have studied some thiophene spectra. Ramart-Lucas (14) has studied steric effects in the spectra of some thiophene derivatives. The present author has previously studied the UV-spectra of 2- and 3-thiophenecarboxylic acid and the corresponding aldehydes (15) and pointed out that the larger bathochromic shifts in the 2-substituted than the 3-substituted thiophenes gave additional evidence for the greater conjugation in 2-substituted thiophenes compared with 3-substituted thiophenes and supported the results obtained by the present author and Rosenberg (16) through IR-spectroscopy. This investigation has now been extended to the isomeric methylketones and methylsulphones, methoxy-, methylthio- and bromothiophenes.

The spectra of the thiophene derivatives are most suitably discussed according to the type of substituent introduced, and the influence of electron-attracting (meta-directing) groups will be considered first. Such 2-substituted thiophenes exhibit two bands, both of which with increasing conjugating power of the substituent are displaced towards longer wavelength (Table 1). Using the terminology of Doub and Vandenberg (2) they will be called the primary and secondary bands of thiophenes. Fig. 1 gives the general form of the curves. As in the benzene series, ϵ increases with increasing conjugation. The bathochromic shift decreases in the following series $-\text{CHO} > -\text{COCH}_3 > -\text{COOH} > -\text{C}\equiv\text{N} > -\text{SO}_2\text{CH}_3$. This is the same order as Doub and Vandenberg (2) have found for the corresponding benzenes. The $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ group shows the smallest bathochromic shift as its conjugation with the thienyl group must involve the 3 d orbitals of sulphur and such conjugation is more difficult. Fehnel and Carmack (17) believe that

Table 1. Ultraviolet absorption characteristics of thiophenes with electron-attracting substituents in position 2.

Substituent	Primary band			Secondary band			
	$\lambda_{\text{max}}, m\mu$	$\tilde{\nu}_{\text{max}}, \text{cm}^{-1}$	$\log \epsilon$	$\lambda_{\text{max}}, m\mu$	$\tilde{\nu}_{\text{max}}, \text{cm}^{-1}$	$\log \epsilon$	$\lambda_{\text{sec}}/\lambda_{\text{prim}}$
-H (9)	215	46,500	3.8	231	43,300	3.87	1.07
-NO ₂ (12)	270	37,000	3.80	296	33,800	3.78	1.10
-CHO	260	38,500	4.04	286	35,000	3.86	1.10
-COCH ₃ (11)	260	38,500	4.01	283	35,300	3.87	1.09
-COOH	246	40,700	3.96	260	38,500	3.84	1.06
-CN (12)	243	41,200	3.97	258	38,800	3.8	1.06
-SO ₂ CH ₃	233	42,900	3.89	252	39,700	3.77	1.08

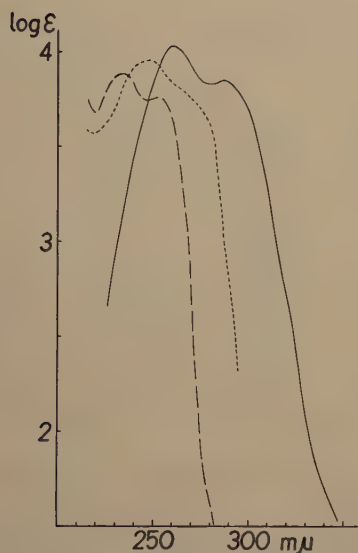


Fig. 1. UV-spectra of — 2-thiophenealdehyde, ----- 2-thiophenecarboxylic acid and — · — · methyl 2-thienyl sulphone.

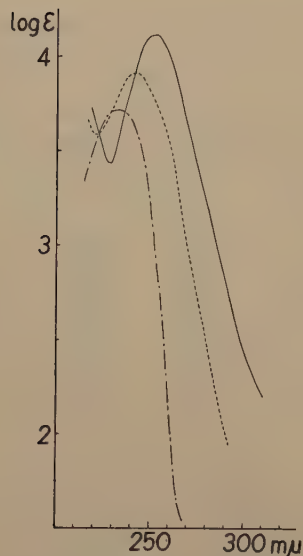


Fig. 2. UV-spectra of — 3-thiophenealdehyde, ----- 3-thiophenecarboxylic acid and — · — · methyl 3-thienyl sulphone.

Table 2. Ultraviolet absorption characteristics of thiophenes with electron-attracting substituents in position 3.

Substituent	Primary band		
	$\lambda_{\max}$, $m\mu$	$\tilde{\nu}_{\max}$, cm^{-1}	$\log \epsilon$
—H	215	46,500	3.5
—CHO	251	39,800	4.12
—COCH ₃	250	40,000	4.08
—COOH	241	41,500	3.92
—SO ₂ CH ₃	232	43,100	3.72

such conjugation is only possible in the excited state, although Bordwell (18) later has presented evidence for such conjugation in the ground state.

In the corresponding 3-substituted thiophenes only one band appears (Fig. 2, Table 2).

The two bands in the 2-substituted compounds can readily be interpreted by analogy with the benzene series as a progressive displacement of the 215 $m\mu$ and the 235 $m\mu$ transition respectively, corresponding to the 203 $m\mu$ and 254 $m\mu$ transition in benzene. In Table 3 the differences in frequency between the bands in substituted thiophenes and those in thiophene are given in wave-numbers. Doub and Vandenbelt gave the differences in wavelength, but it seems more justified to use wave-numbers, which are directly proportional to the difference between the two energy levels involved, in order to compare the thiophene de-

Table 3. Displacement of bands in monosubstituted thiophenes, benzenes and furans.

Substituent	2-substituted thiophenes		3-substituted thiophenes		Benzenes		2-substituted furans
	$\Delta \tilde{\nu}_{\text{prim}}$ (46 500— $\tilde{\nu}_{\text{max}}$)	$\Delta \tilde{\nu}_{\text{sek}}$ (43 300— $\tilde{\nu}_{\text{max}}$)	$\Delta \tilde{\nu}_{\text{prim}}$ (46 500— $\tilde{\nu}_{\text{max}}$)	$\Delta \tilde{\nu}_{\text{sek}}$ (43 300— $\tilde{\nu}_{\text{max}}$)	$\Delta \tilde{\nu}_{\text{prim}}$ (49 100— $\tilde{\nu}_{\text{max}}$)	$\Delta \tilde{\nu}_{\text{sek}}$ (39 400— $\tilde{\nu}_{\text{max}}$)	$\Delta \tilde{\nu}_{\text{prim}}$ (48 100— $\tilde{\nu}_{\text{max}}$)
—NO ₂	9,500	9,500	—	—	11,900	—	—
—CHO	8,000	8,300	6,700	—	9,100	3,700	12,100
—COCH ₃	8,000	8,000	6,500	—	8,400	3,400	—
—COOH	5,800	4,800	5,000	—	5,700	2,700	6,900
—CN	5,300	4,500	—	—	4,500	2,500	—
—SO ₂ CH ₃	3,600	3,600	3,400	—	3,100	1,600	—
—OCH ₃	2,800	2,100	1,300	7,000	3,000	2,200	2,900
—SCH ₃	4,100	6,700	—	6,100	9,700	3,400	—

rivatives with the corresponding benzene derivatives. For comparison some values for some furan derivatives are also given (19).

It should be pointed out that these values are only approximative because of the difficulty in determining the exact location of the primary band in thiophene in solution, since it only appears as an inflexion on the falling branch of the 235 $m\mu$ band.

It can be seen from Table 3 the the displacements of the primary band are of the same order as in the corresponding benzene derivatives. When substituted with weaker electron-attracting groups such as —COOH, —CN or —SO₂CH₃, the displacements are somewhat larger than in the corresponding benzenes. However, when substituted with stronger electron-attracting groups such as —NO₂, —CHO, or —COCH₃, the shifts of the primary band are smaller than in the benzene analogs.

In furans no secondary band exists and the primary band is displaced even more than in benzene (19). Doub and Vandenberg have pointed out the regularity in the amount of displacements of both the primary and secondary bands in the derivatives relative to those in benzene. They obtained $\lambda_{\text{sec}}/\lambda_{\text{prim}} = 1.25$ in the benzene series. The same regularity appears in the 2-substituted thiophenes where $\lambda_{\text{sec}}/\lambda_{\text{prim}} = 1.08 \pm 0.02$. This similarity in influence of substituents speaks strongly for the connection of both bands in thiophene, and likewise in benzene, with the aromatic sextet, and makes less plausible the explanation that the 215 $m\mu$ band is connected with the excitation of one of the p-electrons of the sulphur.

It is interesting that in the 3-substituted thiophenes only one band appears. It could be possible that the 215 $m\mu$ is not displaced in those compounds and that the bands in the 250 $m\mu$ region are displaced 235 $m\mu$ bands. It seems however more probable from comparison with the spectrum of the 2- and 3-furoic acids (20) that the bands obtained are displaced 215 $m\mu$ bands. It may be possible that the secondary band coincides with the displaced primary band.

It seems in any case very probable that the larger bathochromic shifts in the 2-substituted thiophenes indicate that more conjugation occurs than in the corresponding 3-substituted thiophenes (Table 3). The displacement of the second band in 2-substituted thiophenes may be due to a type of conjugation which is most important in 2-substituted thiophenes.

Thiophenes substituted with auxochromic (ortho-para directing) groups such

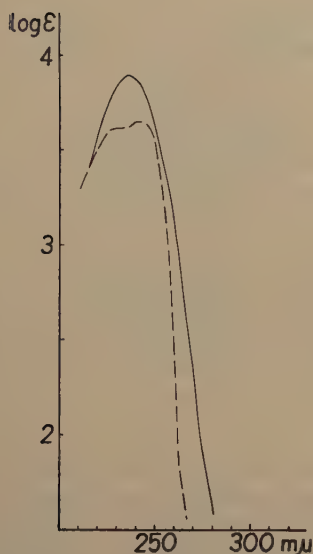


Fig. 3. UV-spectra of — 2-bromothiophene and — — — 3-bromothiophene.

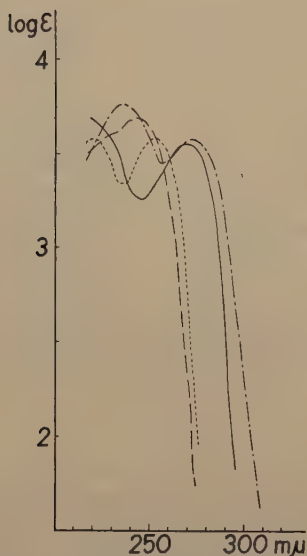


Fig. 4. UV-spectra of ——— 2-methoxythiophene, - - - - 3-methoxythiophene, ····· methyl 2-thienyl sulphide and — · — methyl 3-thienyl sulphide.

as alkyl, $-\text{Br}$, $-\text{OCH}_3$ och $-\text{SCH}_3$ show small but characteristic differences between the 2- and 3-substituted thiophenes. In these cases, however, it is the 2-substituted compounds which show the simpler spectra. Thus 2-methylthiophene (9) 2-*tert*.-butylthiophene (21) and 2-bromothiophene (9) show a single band with maximum at $234 \text{ m}\mu$, $234 \text{ m}\mu$ and $236 \text{ m}\mu$ respectively. In the corresponding 3-substituted compounds the absorption band broadens and two peaks appear at $231 \text{ m}\mu$ and $236 \text{ m}\mu$ in 3-methylthiophene (9) and 3-*tert*.-butylthiophene (21), and at $233 \text{ m}\mu$ and $242 \text{ m}\mu$ in 3-bromothiophene. The 3-substituted thiophenes also show considerably lower ϵ -values. The general shape of the curves is evident from Fig. 3. These bands seem to have arisen through small changes in the $235 \text{ m}\mu$ band of thiophene.

Larger displacements occur when stronger auxochromes such as the $-\text{OCH}_3$ or $-\text{SCH}_3$ group are attached to the thiophene nucleus, making the interpretation easier. The $215 \text{ m}\mu$ chromophore in thiophene is in the 2-substituted compounds displaced to $229 \text{ m}\mu$ in 2-methoxythiophene and to $236 \text{ m}\mu$ in methyl 2-thienyl sulphide. In the 3-substituted thiophenes this band is only slightly displaced to $221 \text{ m}\mu$ in 3-methoxythiophene and to about $216 \text{ m}\mu$ in methyl 3-thienyl sulphide, indicating greater conjugation in the 2-substituted compounds. The secondary band occurs in 2-methoxythiophene at $242 \text{ m}\mu$ and in 3-methoxythiophene at $252 \text{ m}\mu$. In the sulphur analogs these bands occur at $273 \text{ m}\mu$ in the 2-isomer and at $268 \text{ m}\mu$ in the 3-isomer. It is interesting to note that in the $-\text{OCH}_3$ derivative the secondary band exhibits a larger shift in the 3-isomer than in the 2-isomer. In the sulphur analogs the situation is reserved. This is perhaps not so unexpected since according to Mangini and Zauli (22) the type of interaction of the $-\text{SCH}_3$ group is different from that of the methoxyl group. This

Table 4. Ultraviolet absorption characteristic of monosubstituted thiophenes containing auxochromic substituents.

Compounds	Primary band			Secondary band			
	$\lambda_{\max}$, m μ	$\bar{\nu}_{\max}$, cm $^{-1}$	log ϵ	$\lambda_{\max}$, m μ	$\bar{\nu}_{\max}$, cm $^{-1}$	log ϵ	$\lambda_{\text{sec}}/\lambda_{\text{prim}}$
2-Bromothiophene	236	42,400	3.90				
3-Bromothiophene	232	43,100	3.61				
	241	41,500	3.65				
2-Methoxythiophene	229 i	43,700	3.61	243	41,200	3.69	1.06
3-Methoxythiophene	221	45,200	3.59	253	39,500	3.59	1.14
Methyl 2-thienyl sulphide	236	42,400	3.76	273	36,600	3.58	1.16
Methyl 3-thienyl sulphide	216 ?	46,300	3.70	269	37,200	3.56	1.25

is also evident from a calculation of $\lambda_{\text{sec}}/\lambda_{\text{prim}}$ value which for anisole and 2-methoxythiophene is 1.24 and 1.06 and thus of the same order as the values obtained for the other benzenes and 2-substituted thiophenes respectively. For the corresponding sulphur analogs values of 1.10 and 1.16 are obtained. A comparison with the corresponding benzene derivatives (Table 3) shows that the bathochromic effect of these substituents are smaller in the thiophene compounds. Similar results have been obtained for the corresponding furans (19). The results are summarized in Table 4 and the general form of the curves is apparent from Fig. 4.

The absorption of the isomeric monosubstituted thiophenes can thus be represented by a progression of two bands which according to the terminology of Doub and Vandenberg are called the primary and secondary band. The behaviour of the primary band upon substitution is very similar to that of benzenes: The bathochromic shifts are larger on 2-substitution than 3-substitution indicating larger conjugation in the 2-isomers. The behaviour of the secondary band is more complex and the obtained shifts depend upon type of substituent and place of substitution.

Independent of which interpretation of the origin of these bands the future will prove to be correct, it should be emphasized that characteristic differences exists between the spectra of 2- and 3-substituted thiophenes and that these differences should be useful to the organic chemist for the determination of the structure of substituted thiophenes.

Experimental

All the spectrophotometric measurements were made with a calibrated Beckman quartz spectrophotometer model DU, using ethanol as solvent. All the compounds investigated were of highest purity and were recrystallized or distilled before use. The 3-substituted compounds were prepared according to methods described earlier by the present author. The physical properties and literature references are given below.

Compound	B.p./M.p.	Ref.
2-Bromothiophene	150°	23
2-Thiophenecarboxylic acid	128–129° (m.p.)	24
2-Thiophenealdehyde	85° (20 mm)	25
Methyl 2-thienyl sulphide	80–81° (20 mm)	26
Methyl 2-thienyl sulphone	46–47° (m.p.)	27
2-Methoxythiophene	75–76° (55 mm)	13
3-Bromothiophene	157°	28
3-Thiophenecarboxylic acid	138–139° (m.p.)	29
3-Thiophenealdehyde	86–87° (20 mm)	30
3-Acetothienone	57.5–58.5° (m.p.)	31
3-Methoxythiophene	81–82° (65 mm)	32
Methyl 3-thienyl sulphide	93–94° (30 mm)	33
Methyl 3-thienyl sulphone	75–76° (m.p.)	33

SUMMARY

The UV-spectra of twenty monosubstituted 2- and 3-substituted thiophenes have been discussed. The various absorption spectra are analyzed in terms of a progressive displacement of two bands. The spectra of 2-substituted thiophenes are similar to those of the corresponding benzenes; characteristic differences are pointed out. The spectra of 3-substituted thiophenes show certain special features which are discussed. The larger bathochromic shift in 2-substituted thiophenes than in the 3-isomers gives evidence for greater conjugation in the first mentioned compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Professor Arne Fredga for valuable discussions. Thanks are also due to the head of this institute, Professor Nils Hellström, for his kind interest and for all facilities put at the author's disposal.

Institute of Organic Chemistry, Royal Agricultural College, Uppsala, July 1958.

REFERENCES

- GILLAM, A. E. and STERN, E. S., Electronic absorption spectroscopy. London 1954, p. 1161
BRAUDE, E. A. and NACHOD, F. C., Determination of organic structures by physical methods. New York 1955, p. 131.
- DOUB, K. and VANDENBELT, J. M., J. Am. Chem. Soc. *69*, 2714 (1947).
BRAUDE, E. A. and FORBES, W. F., J. Chem. Soc. *1955*, 3776 and earlier paper in this series.
FORBES, W. F. and RALPH, A. S., Can. J. Chem. *34*, 1447 (1956).
- MILAZZO, G., Gazz. chim. ital. *78*, 835 (1948).
- MILAZZO, G., Gazz. chim. ital. *83*, 787 (1953).
- FEHNEL, E. A. and CARMACK, M., J. Am. Chem. Soc. *71*, 84 (1949).
- MENCZEL, S., Z. physik. Chem. *125*, 161 (1927).
- GODART, J., J. Chim. phys. *34*, 70 (1937).
- MOHLER, H., Helv. chim. acta *20*, 1188 (1937).
- Hartough, H. D., Thiophene and derivatives. New York 1952, p. 101–102.
- SZMANT, H. H. and BASSO, A. J., J. Am. Chem. Soc. *73*, 4521 (1951).
- CAMPAIGNE, E. and DIEDRICH, J. L., J. Am. Chem. Soc. *73*, 5240 (1951).
- BOIG, F. S., COSTA, G. W., and OSVAR, I., J. Org. Chem. *18*, 775 (1953).

SALO GRONOWITZ, *UV-spectra of monosubstituted thiophenes*

13. SICÉ, J., J. Am. Chem. Soc. 75, 3697 (1953).
14. RAMART-LUCAS, P., Bull. soc. chim. France 1954, 1017.
15. GRONOWITZ, S., unpublished results. Licentiatavhandling Uppsala 1955.
16. GRONOWITZ, S. and ROSENBERG, A., Arkiv Kemi 8, 23 (1955).
17. FEHNEL, E. A. and CARMACK, M., J. Am. Chem. Soc. 71, 231 (1949).
18. BORDWELL, F. G. and COOPER, G. D., J. Am. Chem. Soc. 74, 1058 (1952).
19. MANLY, D. G. and AMSTUTZ, E. D., J. Org. Chem. 22, 323 (1957).
20. ANDRISANO, R. and PAPPALARDO, G., Gazz. chim. ital. 83, 340 (1953).
21. APPLEBY, W. G., SARTOR, A. F., LEE JR., S. H., and KAPRANOS, S. W., J. Am. Chem. Soc. 70, 1552 (1948).
22. MANGINI, A. and ZAULI, C., J. Chem. Soc. 1956, 4960.
23. BUU-HOI, NG. PH., Ann. 556, 1 (1944).
24. HARTOUGH, H. D. and CONLEY, L. G., J. Am. Chem. Soc. 69, 3096 (1947).
25. WESTON, A. W. and MICHAELS, JR., R. J., J. Am. Chem. Soc. 72, 1422 (1950).
26. CYMERMAN-CRAIG, J. and LODER, J. W., Org. Syntheses 35, 85 (1955).
27. CYMERMAN-CRAIG, J. and LODER, J. W., J. Chem. Soc. 1954, 237.
28. GRONOWITZ, S., Arkiv Kemi 7, 267 (1954).
29. GRONOWITZ, S., Arkiv Kemi 7, 361 (1954).
30. GRONOWITZ, S., Arkiv Kemi 8, 441 (1955).
31. GRONOWITZ, S., Arkiv Kemi 11, 533 (1958).
32. GRONOWITZ, S., Arkiv Kemi 11, 239 (1958).
33. GRONOWITZ, S., Arkiv Kemi 13, 269 (1958).

Tryckt den 22 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Infrarotspektren von Sialinsäuren und Sialinsäuremethylestern

Von INGRID FISCHMEISTER

Mit 4 Figuren im Text

Im Zusammenhang mit den von G. BLIX und Mitarbeitern (1) ausgeführten Studien an Sialinsäuren wurden — zunächst unter dem Gesichtspunkt der Identifizierung — die IR-Spektren untersucht. In dieser Arbeit werden die Spektren für Schweine- (P-), Schaf- (O-), Pferde- (E-) und Rinder- (B-) Sialinsäure und deren Methylester wiedergegeben und ihre Verschiedenheiten aufgezeigt. Schliesslich werden Vergleiche mit Spektren von Zuckern und Zuckerderivaten durchgeführt.

In der Literatur finden sich verschiedentlich Spektren von Sialinsäuren als physikalische Charakteristika. Da die Nomenklatur auf diesem Arbeitsgebiet nicht einheitlich ist, werden in Tab. 1 die im folgenden vorkommenden Synonyme festgehalten. (Eine ausführliche Vergleichstabelle findet sich bei L. SVENNERHOLM (2).)

R. KUHN und R. BROSSMER (3) geben das Spektrum der Methoxyverbindung der Laktaminsäure an, E. KLENK, H. FAILLARD, F. WEYGAND und H. H. SCHÖNE (4) das der N-Acetyl-neuraminsäure aus Submaxillarismucin, sowie das von Neuraminsäure-methylglykosid. F. ZILLIKEN, G. A. BRAUN und P. GYÖRGY (5) zeigen die Übereinstimmung der Spektren von N-Acetyl-neuraminsäure aus Rindermucin und von Gynaminsäure aus menschlicher Milch und Meconium. Weiter stellen E. KLENK und G. UHLENBRUCK (6) das Spektrum der N-Glykoly-neuraminsäure dar, E. KLENK und H. LEMPFRIED (7) das der N-Acetyl-neuraminsäure aus Erythrocytenstroma und H. FAILLARD (8) gibt Spektren von N-Acetyl-neuraminsäure aus Harnmucin und Submaxillarismucin wieder. Schliesslich vergleichen G. T. BARRY und W. F. GOEBEL (9) das Spektrum einer Sialinsäure (vermutlich O-) mit dem der polymeren Colaminsäure. Diese Spektren stimmen, soweit es sich um glykolyfreie N-Acetyl-neuraminsäuren handelt¹, mit dem unserer O-Sialinsäure überein. Das Spektrum der N-Glykoly-neuraminsäure weist ebenfalls keinen, in der verkleinerten Wiedergabe merkbaren Unterschied gegenüber dem der P-Sialinsäure auf. Die vom O-Sialinsäurespektrum abweichenden N-Acetyl-neuraminsäurespektren scheinen mit Mischungsspektren der reinen Acetyl- und Glykolyverbindung, die in Kürze publiziert werden sollen, übereinzustimmen.

Als Bausteine der Sialinsäuren sind nach Abbau- (10) und Syntheseversuchen (11) N-Acetyl-D-glucosamin² und eine β -Ketosäure zu betrachten. In allen Spektren sind

¹ Wie neuere Untersuchungen zeigten (6) haben die N-Acetyl-neuraminsäuren verschiedenen Ursprungs oft Glykolybeimengungen.

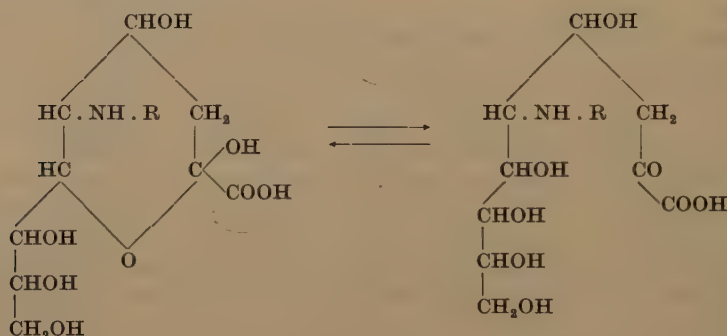
² Zusatz bei der Korrektur, 20.5.1958: D. G. COMB und S. ROSEMAN (J. Am. Chem. Soc. 80, 497, (1958)) finden N-Acetyl-mannosamin als Bestandteil der Sialinsäure.

Tabelle 1. In dieser Arbeit zitierte Synonyme.

P-Sialinsäure	N-Glykoly-neuraminsäure (6)
O-Sialinsäure	N-Acetyl-neuraminsäure (4)
	Gynaminsäure (5)
	Laktaminsäure (3)
Methoxy-neuraminsäure	Neuraminsäure-methylglykosid (4)

daher die für Zucker und die für Karboxylsäuren charakteristischen Absorptionen zu erwarten. Die unten angegebenen Unterschiede hinsichtlich der Substitution einerseits sowie die verschiedenen Röntgen-Pulverdiagramme andererseits lassen jedoch Verschiedenheiten im Infrarotspektrum erwarten.

Für die Besprechung der Spektren soll die Sialinsäure in der von GOTTSCHALK (12) vorgeschlagenen Formel, die allen bisher vorliegenden chemischen Resultaten entspricht, dargestellt werden.



Die durch die chemische Analyse ermittelten Unterschiede zwischen den Sialinsäuren verschiedener Herkunft sind in Tabelle 2 festgehalten.

Tabelle 2.

Herkunft	R	Weiterer Substituent
P (Schwein)	—CO—CH ₂ OH	
O (Schaf)	—CO—CH ₃	
E (Pferd)	—CO—CH ₃	—O—CO—CH ₃ ^a
B (Rind)	—CO—CH ₃	—O—CO—CH ₃ ^b

^a Lage ungewiss.

^b Vermutlich am C₇ (C₁ = COOH) (1).

Die ursprünglichen B-Sialinsäurepräparate sind chromatographisch nicht einheitlich. Es treten 3 Begleitsubstanzen auf, von denen die mit dem kleinsten *R_f*-Wert O-Sialinsäure ist. Die Natur der anderen ist noch unbekannt. Die Röntgenspektren des ursprünglichen und des gereinigten Präparates sind identisch. Auch die IR-Spektren sind gleich (siehe weiter unten). O-Sialinsäure ist chromatographisch einheitlich, während die P-Sialinsäurepräparate meistens geringe Mengen O-Sialinsäure enthalten.

Experimentelles

Die Spektren wurden auf einem Doppelstrahl-Spektrophotometer mit NaCl-Prisma registriert, das nach dem von HORNIG, HYDE und ADCOCK angegebenen Prinzip (13) aufgebaut ist. Der Apparat wurde von Dr. M. SKOGH in diesem Institut gebaut. Zur Herstellung der Aufnahmepräparate wurden die Substanzen mit gefriergetrocknetem Kaliumbromid vermennt und zu Platten gepresst. Die Konzentration war 1,6 mg Substanz auf 300 mg KBr. In den Platten sind die Substanzen unverändert haltbar (Beobachtungen bis zu zwei Jahren unter Ausschluss von Feuchtigkeit). Die experimentelle Unsicherheit der Lagen der Absorptionsmaxima beträgt $\pm 0,015 \mu$.

Spektren der Sialinsäuren

Abb. 1 zeigt die Spektren von P-, O-, E- und B-Sialinsäure zwischen 2,5 und 15 μ . In Abb. 2 sind dieselben Spektren als Strichdiagramme wiedergegeben. Aus beiden Abbildungen geht die grosse Ähnlichkeit der Spektren hervor; es wird daher die allgemeine Zuordnung der wichtigsten Banden für alle Sialinsäuren gemeinsam getroffen.

Die starke Absorption bei 3 μ ist typisch für alle Zucker (15, 14); sie ist durch OH- und hier auch NH-Valenzschwingungen bedingt. Auf dem abfallenden Ast dieser Bande treten bei 3,4 μ die CH-Valenzschwingungen auf und zwischen 3,8 und 4 μ zwei weitere Absorptionen, die charakteristisch sind für die Hydroxylabsorption dimerisierter Säuren oder anderweitig stark wasserstoffbrückegebundener Hydroxyle. Manche Zucker zeigen diese Banden; da sie aber bei den Estern der Sialinsäuren wie auch beim N-Acetyl-glucosamin, der Zuckerkomponente der Sialinsäuren, fehlen, sind sie hier offenbar dem Hydroxyl der Karboxylgruppe zuzuschreiben. Zwischen 5 und 5,5 μ liegt eine sehr schwache Inflexion, die sich auch bei den Estern und — wesentlich stärker — bei der Methoxy-neuraminsäure wiederfindet und erst an Hand dieser besprochen werden soll.

Im Bereich der Carbonyl-Valenzschwingungen liegen bei 5,77–5,79 μ und bei 6 μ zwei starke Absorptionen, die durch die Säure- bzw. Amid-CO-Gruppe hervorgerufen sein dürften. Dabei muss die Bande bei 6 μ die Amid-CO-Bande sein, da solche Banden nicht bei kürzeren Wellen als 5,90 μ beobachtet worden sind (16). Die Carbonylabsorption von Säuren liegt aber bei den hier beobachteten Wellenlängen¹ nur dann, wenn in α -Stellung zur Karboxylgruppe ein elektronegativer Substituent (17) oder eine Hydroxylgruppe (17, 18) vorliegt, die durch Ringbildung eine Bandenverschiebung bewirkt. Ein elektronegativer Substituent ist im Molekül nicht vorhanden, wohl aber wird durch die chemischen Untersuchungen (1) und Synthesversuche (12) eine α -ständige Hydroxylgruppe nahegelegt. Diese Annahme wird also durch die Lage der Karboxyl-CO-Bande bestätigt. Eine Absorptionsbande einer Ketogruppe, die sich von der Amidbande und im Kristall auch von der Karboxyl-CO-Bande unterscheiden sollte, tritt im Spektrum nicht auf. Die Feststellung der α -ständigen Hydroxylgruppe sowie das Fehlen einer Absorption der Ketogruppe weisen darauf hin, dass die Sialinsäure im festen Zustand in der Pyranoseform vorliegt.

¹ Normalerweise, z.B. bei gesättigten aliphatischen Säuren (17), liegt die Carbonylbande zwischen 5,8 und 5,9 μ .

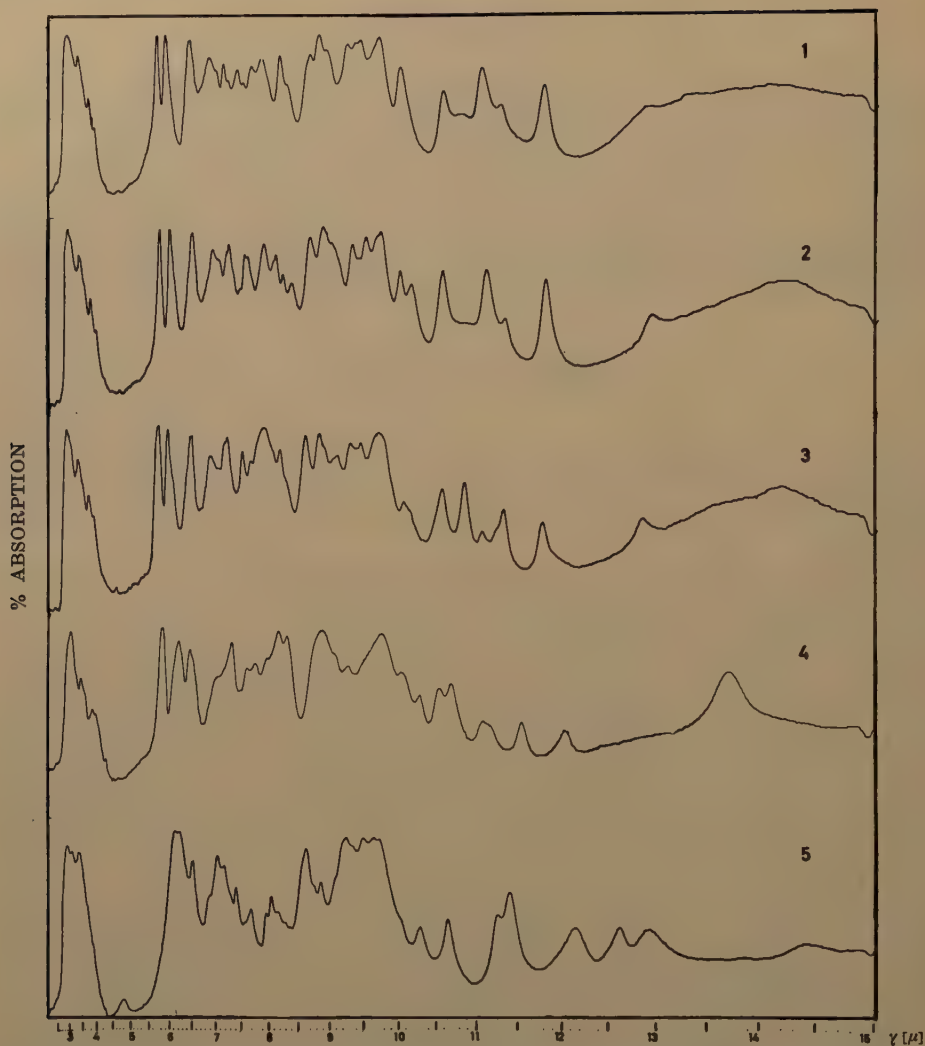


Abb. 1. Spektren der Sialinsäuren. — 1: P- (Schweine-) Sialinsäure, 2: O- (Schaf-) Sialinsäure, 3: E- (Pferde-) Sialinsäure, 4: B- (Rinder-) Sialinsäure, 5: Methoxy-neuraminsäure.

Die starke Absorption zwischen 6,4 und 6,5 μ sollte dann die zweite Bande der Amidgruppe sein. Im Bereich der CH-Deformationsschwingungen zwischen 6,8 und 7,4 μ liegt (wie an einfachen Alkoholen festgestellt wurde (19)), eine OH-Deformationsschwingung, die in komplizierten Molekülen den CH-Schwingungen überlagert sein wird. Mehrere Hydroxyle im Molekül werden das Spektrum noch weiter komplizieren. Auch in den hier vorliegenden Spektren sind die Absorptionsmaxima und Inflexionen dieses Spektralbereichs nicht mehr allein den CH-Schwingungen zuzuordnen.

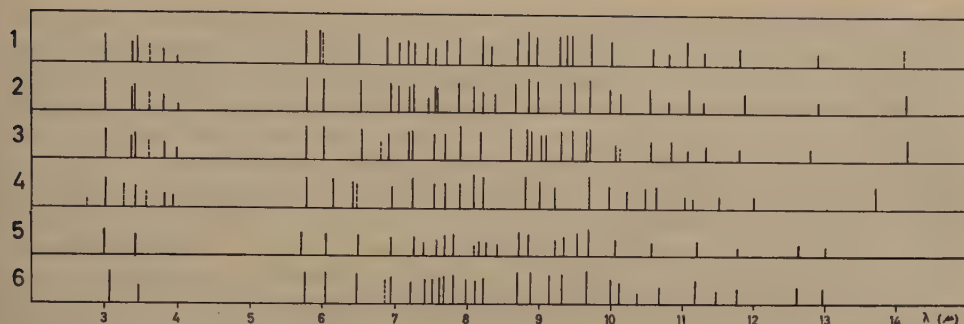


Abb. 2. Strichdiagramme der Sialinsäurespektren. — 1: P-Sialinsäure. 2: O-Sialinsäure. 3: E-Sialinsäure. 4: B-Sialinsäure. 5: O-Sialinsäuremethylester. 6: P-Sialinsäuremethylester.

Im Bereich von $8\text{--}10\ \mu$ ergibt die Überlagerung von Hydroxyl- und wahrscheinlich auch C-OH-Absorptionen mit den Absorptionen des Ätherings das komplizierte Spektrum der Zucker. Zwischen 10 und $15\ \mu$ treten schliesslich Skelett- und Gitterschwingungen auf. In diesem Bereich liegt auch noch die NH-Deformationsschwingung senkrecht zur Gruppenebene, die für eine der dort vorkommenden schwachen Banden verantwortlich sein kann.

Verschiedenheiten der Sialinsäurespektren

Der Vergleich der einzelnen Spektren und Strichdiagramme zeigt, dass die Absorptionsbanden im Gebiet zwischen 3 und $4\ \mu$ gleiche Lage, aber etwas verschiedene Bandenbreite haben. Bei B-Sialinsäure tritt zusätzlich eine Inflexion bei $2,74\ \mu$ auf, die auf freie Hydroxylgruppen hindeutet. Auch die Absorptionen zwischen $3,5$ und $4\ \mu$ sind hier etwas verschoben. Diese Verschiedenheiten deuten auf geringe Unterschiede in den Wasserstoffbrückenbindungen hin. Im Bereich der Karbonyl- und Amidabsorptionen haben sämtliche Sialinsäuren gleiche Lage der Karboxyl-CO-Absorption ($5,78\ \mu \pm 0,015\ \mu$). Die Amidbanden sind nur für drei Sialinsäuren (P, O und E) gleich ($6,02$ und $6,53\ \mu$), wobei die Amid-CO-Bande der P-Sialinsäure eine deutliche — wenn auch nur knapp über der Fehlergrenze liegende — Verschiebung um $0,04\ \mu$ nach kürzeren Wellen aufweist. Bei B-Sialinsäure sind beide Amidbanden zueinander verschoben ($6,15\ \mu$ und $6,41\ \mu$) und stark verbreitert. Zu bemerken ist noch, dass die Intensität der Karboxyl-CO-Bande im Spektrum der E- und B-Sialinsäure grösser ist als in dem der P- und O-Sialinsäure.

Der komplexe Absorptionsverlauf zwischen 7 und $10\ \mu$ weist mannigfaltige Unterschiede in den Einzelabsorptionen auf, wobei sich die P-Sialinsäure von den anderen durch die geringe Intensität der Bande bei $7,25\ \mu$ und die grosse Intensität jener bei $8,3\ \mu$ abhebt. Im E- und B-Sialinsäurespektrum treten sehr starke Absorptionsbanden bei $8\ \mu$ auf; im B-Sialinsäurespektrum allein ist die Bande bei $6,9\ \mu$ sehr schwach. Die gruppenweise Anordnung der Absorptionsmaxima zwischen $8,5$ und $10\ \mu$ ist für alle Sialinsäuren die gleiche und soll beim Vergleich mit den Zuckern besprochen werden.

Im Bereich der Skelett- und Gitterschwingungen zwischen 10 und $15\ \mu$ zeigen P- und O-Sialinsäure identische Absorptionen. E- und B-Sialinsäure unterscheiden

sich von den eben genannten und auch von einander. Die Moleküle von P- und O-Sialinsäure scheinen somit sehr ähnlich aufgebaut zu sein. Der Unterschied im E- und B-Sialinsäurespektrum kann durch verschiedene Skelett- und/oder Gitterschwingungen hervorgerufen sein, wobei der Umstand, dass P- und O-Sialinsäure trotz verschiedenen Röntgenspektrums gleiche IR-Absorptionen in diesem Bereich haben, die Skelettschwingungen als ausschlaggebend erscheinen lässt.

Wie stimmen nun die hier gefundenen Unterschiede mit den durch die chemischen Studien festgestellten überein?

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, unterscheiden sich *P-* und *O-Sialinsäure* durch Glykolyl- bzw. Acetylsubstitution an der Amidgruppe. Die CH_3 -Gruppe des Acetylrestes (die einzige im Molekül) wird im Spektrum der O-Sialinsäure in der Absorption bei $7,25 \mu$ sichtbar. (Die schwache Absorption bei dieser Wellenlänge im P-Sialinsäurespektrum kann von einem geringen Methylester- (1) und vielleicht auch geringem Acetylgruppengehalt herrühren.) Im Spektrum der Glykolylverbindung (P-Sialinsäure) wurde die starke Absorption bei $8,3 \mu$ schon von KLENK und UHLENBRUCK (6) der Glykolylgruppe zugeschrieben. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu beachten, dass auch absolut glykolylfreie O-Sialinsäure (und, nach den im Druck wiedergegebenen Spektren, auch N-Acetylneuraminsäure aus Harnmucin (8) sowie aus Erythrocytenstroma (7)) ein schwaches Maximum bei derselben Wellenlänge aufweisen. Der im P- und O-Sialinsäurespektrum auftretende kleine Unterschied in der Amid-CO-Bandenlage kann durchaus durch die verschiedenen Substituenten bewirkt sein, der Mangel an Vergleichsmaterial erlaubt aber keine bestimmte Aussage.

E-Sialinsäure hat zusätzlich zur N-Acetyl- eine O-Acetylgruppe. Deren Karbonylabsorption liegt in acetylierten Zuckern (14) und Polysacchariden (20) bei $5,77 \mu$, sodass bei dem vorliegenden Spektrum Überlagerung mit der Karboxyl-CO-Bande bei $5,78 \mu$ zu erwarten ist. Tatsächlich tritt auch keine neue Karbonylbande auf, sondern die Bande bei $5,78 \mu$ erscheint mit vermehrter Intensität. Die für Acetate charakteristische Absorption bei ca. 8μ (21) tritt stark auf und hat ihr Maximum in diesem Spektrum bei $7,90 \mu$.

B-Sialinsäure hat die gleichen Substituenten wie E-Sialinsäure, nur wird für die O-Acetylgruppe eine andere Lage im Molekül vorgeschlagen (1). (Zersetzungspunkt, Drehungsvermögen und chromatographisches Verhalten unterscheiden sich allerdings stark von denen der E-, O- und P-Sialinsäure.) Die Spektren der B- und E-Sialinsäure weisen gleiche Karboxyl- und Ester-CO-Bandenlage bei $5,78 \mu$ auf, die Acetatabsorption liegt hingegen für B-Sialinsäure bei $8,09 \mu$ gegenüber $7,90 \mu$ für E-Sialinsäure. Die Verschiedenheiten der Amidbandenlagen, der OH-Valenzschwingungen und das Auftreten der Bande bei $13,72 \mu$ zeigen auch spektral den Unterschied der B-Sialinsäure gegenüber den anderen Sialinsäuren an. Ob die Bande bei $13,72 \mu$ durch eine NH-Deformationsschwingung, durch Skelett- oder durch Gitterschwingungen hervorgerufen ist, könnte wohl erst durch Deuteriumaustausch bzw. Lösungsaufnahmen klargestellt werden. Bei der chromatographischen Reinigung werden, wie erwähnt, aus den B-Sialinsäurepräparaten mehrere Begleitsubstanzen abgetrennt. Das Spektrum der chromatographisch gereinigten Substanz, das in Abb. 1 wiedergegeben ist, unterscheidet sich von dem des ursprünglichen Präparates nicht. Die Isolierung der Begleitsubstanzen ist noch im Gange; von der mit dem grössten R_f -Wert wurde orientierend ein IR-Spektrum aufgenommen, das den Sialinsäurespektren sehr ähnlich ist.

Die hier angezeigten Unterschiede erlauben offensichtlich eine IR-spektrographische Identifizierung der einzelnen Sialinsäuren, wobei für P-Sialinsäure am besten

die starke Absorption bei $8,3 \mu$ und für O-Sialinsäure die vier Absorptionen mit regelmässig fallender Intensität von $7,8-8,4 \mu$ herangezogen werden. Das Spektrum der E-Sialinsäure zeichnet sich durch die starke Absorption bei $7,09 \mu$ aus und im Spektrum der B-Sialinsäure schliesslich ist die Lage der Amidbanden und die Bande bei $13,72 \mu$ charakteristisch.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die B-Sialinsäurepräparate einen geringen Glykolylgehalt haben (22). Die Spektren dieser Präparate zeigen dies aber nicht an, da die starke Acetatbande um 8μ die schwächere Glykolylbande bei $8,3 \mu$ überdeckt.

Spektren der Sialinsäuremethylester

Die Darstellung des O-Sialinsäuremethylesters wird entweder aus O-Sialinsäure direkt (23) oder aus B- bzw. E-Sialinsäure (unter Abspaltung der O-Acetylgruppe) (1) durchgeführt. Die Spektren der mit den verschiedenen Methoden hergestellten Ester sind identisch und eines davon ist in Abb. 3 neben dem eines P-Sialinsäuremethylesters dargestellt. (Die Spektren der P-Sialinsäurepräparate deuten auf verschiedenen Glykolylgehalt hin. Glykolylbestimmungen wurden daran nicht durchgeführt.)

Für Ester charakteristisch ist das Fehlen der OH-Absorptionen bei $3,8$ und 4μ (die Hydroxylbande bei 3μ und die CH-Absorptionen sind unverändert).

Bei $3,9$ und 5μ treten ähnlich wie in den Sialinsäurespektren Inflexionen auf, die weiter unten besprochen werden.

Die bei der Veresterung dimerisierter Säuren übliche Verschiebung der Karbonylabsorption um ca. $0,10 \mu$ nach kürzeren Wellen tritt bei den Sialinsäuren nur in bedeutend geringerem Masse auf ($0,03-0,04 \mu$). Die Ester-CO-Banden haben die für gesättigte aliphatische Ester normale Lage bei $5,75 \mu$. Dass die Karboxyl-CO-Banden der Sialinsäuren bei Veresterung nicht die normale Verschiebung zu kürzeren Wellen erfahren, ist nur so zu verstehen, dass entweder die α -ständige Hydroxylgruppe bei Estern nicht denselben Einfluss ausübt wie bei Säuren, oder dass sie — durch Methoxylierung oder Aufgehen des Ringes — verändert ist.

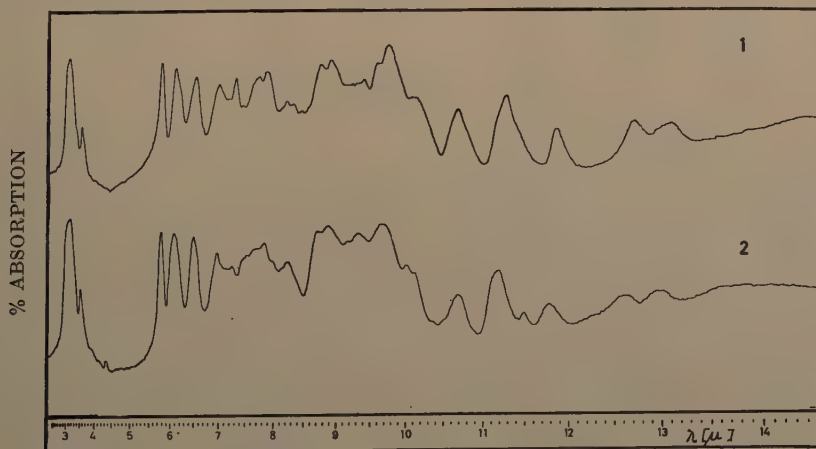


Abb. 3. Spektren der Sialinsäuremethylester. — 1: O-Sialinsäuremethylester.
2: P-Sialinsäure-methylester.

Tabelle 3. Wellenlängen der Absorptionsmaxima der Spektren von Sialinsäuren, Sialinsäuremethylestern und der Methoxy-neuraminsäure.

P	Sialinsäuren, λ [μ]			Sialinsäure- methylester, λ [μ]		Methoxy-neuramin- säure, λ [μ]
	O	E	B	O	P	
3,02	3,01	3,01	3,02	3,00	3,07	3,03
3,43	3,42	3,42	3,42	3,43	3,46	3,21
3,80	3,81	3,81	3,82	—	—	3,47
3,98	4,00	3,98	3,93	—	—	3,50
5,78	5,78	5,79	5,77	5,75	5,76	4,81
5,98	6,02	6,01	6,15	6,05	6,05	6,16
6,52	6,53	6,54	6,41	6,48	6,49	6,25
6,92	6,95	6,92	6,96	6,96	6,95	6,54
7,20	—	—	—	—	7,22	6,88
7,29	7,26	7,25	7,24	7,27	—	7,04
7,47	—	—	—	7,40	—	7,18
7,58	7,57	7,54	7,54	7,58	7,52	7,40
7,73	7,60	7,69	7,70	7,70	7,69	7,68
7,92	7,90	7,92	7,90	7,82	7,82	7,95
—	8,10	—	8,10	8,17	7,98	8,03
8,23	8,22	8,20	8,23	8,28	8,23	8,15
8,35	8,38	—	—	8,42	—	8,62
8,72	8,67	8,62	—	8,72	8,70	8,73
8,86	8,87	8,84	8,81	8,86	8,87	8,84
8,97	—	9,10	9,01	—	9,16	9,23
9,30	9,31	9,31	9,21	9,35	9,32	9,31
9,41	—	—	—	—	—	9,48
9,48	9,50	9,46	—	9,54	—	9,63
9,74	9,72	9,71	9,70	9,70	9,66	9,71
10,03	9,99	—	9,98	10,06	10,00	10,27
—	10,14	10,07	10,23	—	10,12	10,62
10,60	10,55	10,57	10,49	10,61	10,68	11,25
10,83	—	10,85	10,65	—	—	11,39
11,08	11,10	11,07	11,03	11,22	11,18	12,12
11,32	11,31	11,32	11,14	—	11,48	12,61
11,82	11,88	11,78	11,51	11,79	11,78	12,90
12,91	12,92	12,83	12,00	12,63	12,61	14,43
14,1	14,2	14,17	13,72	13,02	12,97	

Methoxylierung würde sich im Spektrum oberhalb $7,5 \mu$ zu erkennen geben, wie der Vergleich des Spektrums vom P-Sialinsäuremethylester mit einem zu diesem Zweck aufgenommenen Spektrum eines Methoxy-P-Sialinsäuremethylesters zeigte. Ein Aufgehen des Ringes ist ebenfalls auszuschliessen, weil die dann auftretende Keto-gruppe eine von der Ester-CO- und auch von der Amid-CO-Bande unterscheidbare Carbonylbande hervorrufen müsste. Die andere Alternative — verschiedener Einfluss der α -ständigen OH-Gruppe auf die Carbonylfrequenz in Säuren und in Estern — erscheint dagegen denkbar, wenn man mit JONES und SANDORFY (18) annimmt, dass die Bandenverschiebung bei Säuren durch intramolekulare Fünfringbildung an der dimerisierten Karboxylgruppe zustande kommt. Bei den nicht dimerisierenden Estern besteht die Möglichkeit dieser Beeinflussung nicht und es wäre daher auch keine Verschiebung der CO-Frequenz zu erwarten.

Spektrum der Methoxy-neuraminsäure

Das in Abb. 1 aufgenommene Spektrum der Methoxy-neuraminsäure ist ähnlich dem von KLENK und Mitarb. (4) publizierten, auf Grund dessen die Verfasser Zwitterionenstruktur für diese Verbindung vorschlagen. Folgende Banden sind für diese Struktur charakteristisch: Die Absorption der NH_3^+ -Gruppe in der Nähe von $3,26 \mu$ (24, 15), die statt der NH-Valenzschwingung auftritt, die des Karboxylations zwischen 6 und $6,3 \mu$ (stark) (15) anstelle der Karboxyl-CO-Absorption, und die Deformationsschwingungen der NH_3^+ -Gruppe bei $6,1$ – $6,2$ (schwach) und $6,47$ – $6,67$ (stark) (16). Eine schwache, für die Erkennung von Aminosäuren aber sehr wertvolle Bande liegt noch bei $4,76 \mu$.

In unserem Spektrum scheint die Bande bei $3,21 \mu$ durch die NH_3^+ -Gruppe hervorgerufen zu sein, da sie in den Spektren der N-acetylierten Verbindungen nicht auftritt. Die starke Bande mit den zwei Maxima bei $6,16$ und $6,25 \mu$ dürfte die des Karboxylations sein, die wahrscheinlich die schwache Absorption der NH_3^+ -Gruppe bei $6,1$ – $6,2 \mu$ überdeckt. Bei $6,54 \mu$ liegt dann die zweite Bande der NH_3^+ -Gruppe, und bei $4,76 \mu$ ist die eben erwähnte Aminosäureabsorption zu erkennen. Alle diese, für die Zwitterionenstruktur von nicht nur α -, sondern auch β - und ϵ -Aminosäuren (16) charakteristischen Banden treten in unserem Methoxy-neuraminsäurespektrum auf und bestätigen den Vorschlag von KLENK und Mitarbeitern.

Die schwachen Absorptionen zwischen 4 und 5μ sind den Amino- und Amidosäuren gemeinsam und das deutliche Auftreten der Absorption bei $4,76 \mu$ im Spektrum der Methoxy-neuraminsäure, die als Aminosäure zu betrachten ist, erklärt auch die früher erwähnten schwachen Inflexionen in den Sialinsäure- und Esterspektren. Diese liegen in dem für Amidosäuren beobachteten Intervall und lassen die Betrachtung der Sialinsäuren als Amidosäuren als gerechtfertigt erscheinen. Hiermit stimmt überein, dass die Amid- und Carbonylgruppenabsorptionen in den Sialinsäurespektren normale Lagen haben, wie in Spektren von Amidosäuren.

Zwischen $8,5$ und 10μ treten auch im Spektrum der Methoxy-neuraminsäure starke Karboxylabsorptionen auf, die aber nicht die gleiche Lage haben wie in den Sialinsäurespektren.

Vergleich mit Zuckerspektren

Zwischen $8,5$ und 10μ haben die Spektren der Sialinsäuren und deren Methylester als gemeinsamen Zug zwei Hauptmaxima bei $8,8$ – $9,0 \mu$ und $9,6$ – $9,8 \mu$ und zwei Minima bei $8,5$ und $9,2 \mu$. Die Anzahl der schwächeren Absorptionen variiert. Da die Absorptionen in diesem Spektralbereich zum grössten Teil durch Überlagerung der Ätherring- und Hydroxylabsorptionen (15) zustande kommen, wurde mit den Spektren der möglicherweise am Aufbau des Sialinsäuremoleküls beteiligten Zucker verglichen. Es wurden Glucose und Galaktose, N-Acetyl-glucosamin und N-Acetyl-galaktosamin, sowie Glucosamin und Galaktosamin (beide als Hydrochloride) in KBr gepresst aufgenommen (Abb. 4). Dabei zeigte sich, dass die oben erwähnten Züge der Sialinsäurespektren nur im Spektrum der Glucose und dem des N-Acetyl-glucosamins wiederzufinden sind, wobei die Übereinstimmung mit letzterem besser ist. Die Spektren der Galaktose- und des N-Acetyl-galaktosamins unterscheiden sich von denen der Glucose und des N-Acetyl-glucosamins hauptsächlich durch die wesentlich kleinere Intensität der Bande bei $9,7 \mu$. Die Spektren des Glucosamin-

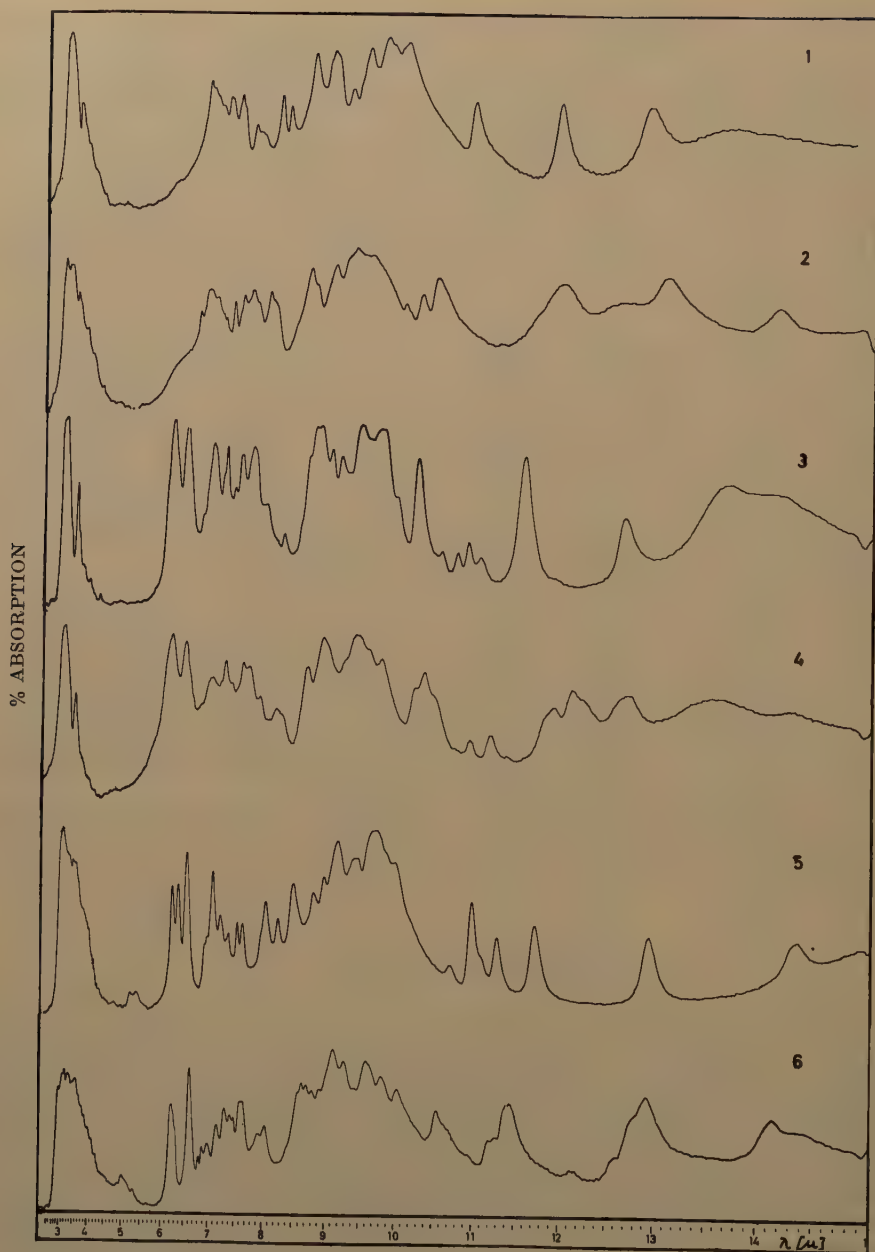


Abb. 4. Spektren von Zuckern. — 1: Glucose. 2: Galaktose. 3: N-Acetyl-glucosamin. 4: N-Acetyl-galaktosamin. 5: Glucosamin-HCl. 6: Galaktosamin-HCl.

und Galaktosamin-Hydrochlorids weichen, wohl infolge der Salzbildung, so stark von den schon besprochenen ab, dass sie in den Vergleich nicht einbezogen werden können.

Ein Vergleich der Spektren von Glucose und Galaktose einerseits sowie von Glucose und Sorbit andererseits zeigt, dass im hier diskutierten Bereich der Unterschied zwischen den Zuckerisomeren grösser ist als der zwischen Zucker und Zuckeralkohol. Dies würde bedeuten, dass die Stellung der Hydroxylgruppen in den Isomeren das Spektrum stärker beeinflusst als das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein des Ätherringes. Für die Glukose ist aus der Kristallstrukturbestimmung (25) bekannt, dass alle Hydroxylgruppen an starken Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, die den Zusammenhang der Moleküle im Kristall bewirken (die Van der Waalschen Kräfte scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen). Man kann annehmen, dass Ähnliches bei allen Zuckern im festen Zustand angestrebt wird, soweit die Kristallstruktur dies zulässt. Dies würde die starke Konfigurationsabhängigkeit der Bandengruppierung in diesem Spektralbereich, verständlich machen. Es scheint also vor allem die Änderung des intermolekularen Bindungssystems in diesem Bereich des Spektrums sichtbar zu werden. Demnach würde die gefundene Übereinstimmung der Spektren in diesem Bereich nahelegen, dass die Hydroxylgruppen in den Sialinsäuren ähnlich gebunden sind wie im N-Acetyl-glucosamin.

Zusatz bei der Korrektur, 20.5.1958: Kürzlich haben D. G. COMB und S. ROSEMAN (l. c.) wahrscheinlich gemacht, dass der Zuckerbestandteil der Sialinsäure N-Acetyl-mannosamin ist. Da uns diese Substanz nicht kristallisiert zugänglich war, konnte sie nicht zum Vergleich herangezogen werden. W. OTTING (Ann. 612, 68, (1958)) hat aber die Publikation ihres Spektrums angekündigt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Spektren der Sialinsäuren und ihrer Ester bestätigen das Vorhandensein sämtlicher, durch die chemischen Studien aufgezeigten, funktionellen Gruppen. Darüber hinaus weisen die Spektren durch die Lage der Hydroxylabsorptionen auf die Bindung aller Hydroxylgruppen durch Wasserstoffbrücken und auf Dimerisierung der Karboxylgruppe hin. Die nach kürzeren Wellen verschobene Karboxyl-CO-Bande zeigt die Anwesenheit einer α -ständigen Hydroxylgruppe an, in Übereinstimmung mit den Folgerungen aus den chemischen Untersuchungen. Die Forderung der α -ständigen Hydroxylgruppe sowie das Fehlen der Karbonylabsorption einer Ketogruppe lässt auf Pyranoseform der Sialinsäure im festen Zustand schliessen.

Die schwachen Absorptionen zwischen 4 und 5 μ zeigen, dass die Sialinsäure eine Amidosäure ist. Die gleiche Absorption im Methoxy-neuraminsäurespektrum sowie die Karboxylation- und NH_3^+ -Absorption machen die Zwitterionenstruktur dieser als Aminosäure zu betrachtenden Verbindung deutlich.

Prof. BLIX soll für die Anregung zur Untersuchung der Sialinsäuren und für die Bereitstellung sämtlicher Präparate sowie für wertvolle Diskussionen gedankt werden. Prof. STENHAGEN bin ich für sein Interesse und für wichtige Hinweise während der Arbeit zu Dank verpflichtet. Für technische Hilfe danke ich Frau K. NILSSON.

Abteilung für medizinische Biochemie, Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Uppsala, Uppsala, Schweden.

LITERATUR

1. BLIX, G., LINDBERG, E., ODIN, L., und WERNER, I., *Acta soc. med. upsaliensis* 61, 1 (1956).
2. SVENNERHOLM, L., *Arkiv Kemi* 10, 577 (1957).
3. KUHN, R., BROSSMER, R., und SCHULZ, W., *Chem. Ber.* 87, 123 (1954).
4. KLENK, E., FAILLARD, H., WEYGAND, F., und SCHÖNE, H. H., *Z. physiol. Chem.* 304, 35 (1956).
5. ZILLIKEN, F., BRAUN, G. A., und GYÖRGY, P., *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 394 (1956).
6. KLENK, E., und UHLENBRUCK, G., *Z. physiol. Chem.* 307, 266 (1957).
7. KLENK, E., und LEMPFER, H., *Z. physiol. Chem.* 307, 278 (1957).
8. FAILLARD, H., *Z. physiol. Chem.* 307, 62 (1957).
9. BARRY, G. T., und GOEBEL, W. F., *Nature* 179, 206 (1957).
10. KUHN, R., und BROSSMER, R., *Chem. Ber.* 89, 2471 (1956).
11. CORNFORTH, I. W., DAINES, M. E., und GOTTSCHALK, A., *Proc. Chem. Soc.*, 1957, 25.
12. GOTTSCHALK, A., *Nature* 176, 881 (1955).
13. HORNIG, D. F., HYDE, G. E., und ADCOCK, W. A., *J. Opt. Soc. Am.* 40, 479 (1950).
14. KUHN, L. P., *Anal. Chem.* 22, 276 (1950).
15. THOMPSON, H. W., NICHOLSON, D. L., und SHORT, L. N., *Discussions Faraday Soc.* No. 9, 222 (1950).
16. RANDALL, H. M., FOWLER, R. G., FUSON, N., und DANGL, J. R., *Infrared Determinations of Organic Structures*. Van Nostrand, 1949.
17. FLETT, M. St. C., *J. Chem. Soc.* 1951, 962.
18. JONES, R. N., und SANDORFY, C., Kapitel: The application of infrared and Raman spectroscopy to the elucidation of molecular structure, in: *Chemical Applications of Spectroscopy*. Interscience Publishers, 1956.
19. SUTHERLAND, G. B. B. M., *Discussions Faraday Soc.* No. 9, 274 (1950).
20. LEVINE, S., STEVENSON, H. J. R., und KABLER, P. W., *Arch. Biochem. Biophys.* 45, 65 (1953).
21. THOMPSON, H. W., und TORKINGTON, P., *J. Chem. Soc.* 1945, 640.
22. BLIX, G., unveröffentlicht.
23. SVENNERHOLM, L., *Acta soc. med. upsaliensis* 61, 75 (1956).
24. FREYMAN, M., und FREYMAN, R., *Proc. Indian Acad. Sci.* 8, 301 (1938).
25. McDONALD, T. R. R., und BEEVERS, C. A., *Acta Cryst.* 5, 656 (1952).

Tryckt den 23 oktober 1958

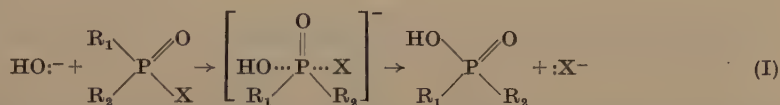
Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

An investigation of the association of phenol with isopropoxy-methyl-phosphoryl fluoride (Sarin) and some related compounds

By LENNART LARSSON

With 4 figures in the text

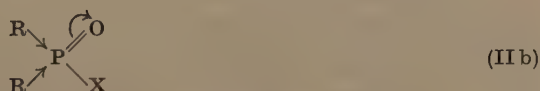
It has been found that the alkaline hydrolysis of organic phosphorus compounds proceeds by a nucleophilic attack of the hydroxyl ion on the phosphorus atom according to the following scheme



where R_1 and R_2 are alkyl, alkoxy or dialkylamino groups and X a basic residue such as halogen, or a cyano or disubstituted phosphoryloxy group (1-4). It has further been postulated that the rate of this reaction depends upon the electronic density of the phosphorus atom which is controlled by the inductive and mesomeric effects of the substituents (1, 3, 4). It is to be expected that these effects will be reflected in the electron distribution in the $\text{P}=\text{O}$ bond, i.e. the electronic density of the phosphorus atom and the polarity of the $\text{P}=\text{O}$ bond in a compound which can be symbolized by the formula



will be low, thus facilitating a nucleophilic attack, while the electronic density of the phosphorus atom and the polarity of the $\text{P}=\text{O}$ bond in a compound represented by the formula

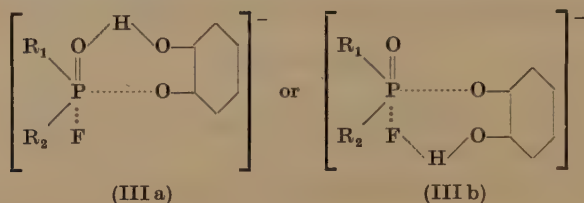


will be high and thus the compound less reactive.

A measure of the polarity of the $\text{P}=\text{O}$ bond would be possible to obtain from a study of the ability of the oxygen atom to form hydrogen bonds e.g. with phenol. Infra-red spectroscopy is quite a useful tool for such a study and was therefore applied

to determine the association constants of the complexes between phenol and eight organic phosphorus compounds. The ability of organic phosphorus compounds to form complexes with chloroform has earlier been observed from determinations of the heat of mixing (5) and from a study of the frequency shifts of the absorption band of the phosphoryl group (6).

It has also been postulated that the enhanced reactivity of catechols towards Sarin as compared to phenols can be ascribed to the formation of a hydrogen bond in the transition state (7) such as



Also, the great reactivity of the perhydroxyl ion toward Sarin has been attributed to the formation of a hydrogen bond (8). It seemed reasonable that an infra-red spectroscopic study of the association of Sarin with phenol would elucidate which of the structures (III a) or (III b) is most probable.

Experimental

Materials

The phosphorus compounds studied were synthesized in this institute. With the exceptions of dimethylamido-methyl-phosphoryl fluoride and ethylthio-methyl-phosphoryl fluoride they have already been described in the literature. The formulae, densities and refractive indices of the compounds and the references to the methods of synthesis are given in Table 1 with the exception of the data on the three alkoxy-alkyl-phosphoryl fluorides which has been given in an earlier report (4).

Table 1. The formulae, densities and refractive indices of the organic phosphorus compounds studied and the references to the methods of synthesis.

Compound	$\begin{array}{c} R_1 \quad O \\ \quad \diagdown \quad \parallel \\ \quad P \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ R_2 \quad X \end{array}$			d_4^{25}	n_D^{25}	Ref.
	R_1	R_2	X			
Dimethylamido-methyl-phosphoryl fluoride	CH ₃	(CH ₃) ₂ N	F	1.129	1.4085	This paper
Bis-dimethylamido-phosphoryl fluoride	(CH ₃) ₂ N	(CH ₃) ₂ N	F	1.115 ²⁰	1.4267 ²⁰	(9)
Ethylthio-methyl-phosphoryl fluoride	CH ₃	C ₂ H ₅ S	F	1.203	1.4630	This paper
Diisopropoxy-phosphoryl fluoride (DFP)	(CH ₃) ₂ CHO	(CH ₃) ₂ CHO	F	1.055	1.3800	(10)
Dimethylamido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun)	(CH ₃) ₂ N	C ₂ H ₅ O	CN	1.073	1.4250 ²⁰	(9)

Table 2. Analytical data.

Compound	Formula	M	% C		% H		% N		B.p. °C/mm Hg	Yield in %
			Calc.	Found	Calc.	Found	Calc.	Found		
Dimethylamido-methyl-phosphoryl fluoride	$\text{C}_3\text{H}_9\text{FNOP}$	125.1	28.8	28.9	7.3	7.4	11.2	11.1	43-45/0.6	45
Ethylthio-methyl-phosphoryl fluoride	$\text{C}_3\text{H}_8\text{FOPS}$	142.1	25.4	25.6	5.7	6.0	13.4	13.3	58/4.5	20

Dimethylamido-methyl-phosphoryl fluoride.—A solution of 2 moles of dimethylamine in 800 ml of anhydrous ether was slowly added to 1 mole of methyl-phosphoryl dichloride (11) dissolved in 700 ml of anhydrous ether, with cooling. The precipitate formed was filtered off, and dimethylamido-methyl-phosphoryl chloride was isolated from the filtrate by means of distillation. B.p. 84°C/4 mm Hg.

One mole of this chloride was added to 2.4 moles of pulverized sodium fluoride suspended in 150 ml of carbon tetrachloride. The reaction mixture was heated to 85°C for two hours and stirred by means of a current of nitrogen. After cooling, the mixture was filtered and the filtrate fractionated by distillation at reduced pressure. For analytical data see Table 2.

Ethylthio-methyl-phosphoryl fluoride.—One mole of methyl-phosphoryl dichloride and 1 mole of ethanethiol in 850 ml of ether were mixed with 1.05 moles of trimethylamine. The reaction mixture was refluxed for one hour. After cooling, triethylammonium chloride was filtered off and the filtrate fractionated at reduced pressure. B.p. 50°C/0.3 mm Hg.

The ethylthio-methyl-phosphoryl chloride formed was transformed to the fluorine derivative in the same manner as described above. For analytical data see Table 2.

Phenol, E. Merck, reagent grade.

Solvents: Carbon tetrachloride, E. Merck, reagent grade, and cyclohexane, c.p., were dried over calcium chloride before use in the infra-red spectrometric study.

Infra-red spectrometric measurements

The infra-red absorption spectra were recorded with a Perkin-Elmer spectrophotometer, Model 21, equipped with a rock-salt prism. No special arrangements were made to maintain the temperature of the absorption cells constant, but the instrument was placed in a room with a constant temperature of 25°C, and the temperature close to the cells was found to be $30.1 \pm 0.6^\circ\text{C}$. Two series of spectra were recorded: one of the organic phosphorus compounds with and without phenol between 2.0 and 15.0 μ to elucidate the frequency shifts of the absorption bands caused by association with phenol, and the other with various concentrations of the phosphorus compounds and of phenol between 2.5 and 3.5 μ to determine the association constants of the compounds with phenol.

In the first series the concentrations of the phosphorus compounds as well as of phenol were 0.20 M. The following solvents were used: carbon tetrachloride between 2.0 and 12.0 μ and cyclohexane between 11.8 and 15.0 μ . The thickness of the cells was 0.11 mm. The following settings of the instrument were used: Resolution 927; response 2:1170; gain 5.5; suppression 3; speed about 1 μ /min; scale 5 cm/ μ .

Table 3. The association constants, K_{ass} , frequencies of the P=O band and P-F band, $\nu_{\text{P=O}}$ and $\nu_{\text{P-F}}$, frequency shifts of the P-F band, $\Delta\nu_{\text{P-F}} = \nu_{\text{P-F(ass)}} - \nu_{\text{P-F}}$, force constants, $k_{\text{P-F}}$, and second-order hydrolytic rate constants, k_2^{25} , for the phosphorus compounds studied.

Compound	K_{ass} for $[\text{S}_0]/[\text{P}_0] =$				$\nu_{\text{P=O}}$	$\nu_{\text{P-F}}$	$\Delta\nu_{\text{P-F}}$	$k_{\text{P-F}} \times 10^{-5}$	k_2^{25}	Ref.
	15/15	15/30	30/15	30/30	cm^{-1}	cm^{-1}	cm^{-1}	dyne cm^{-1}	$\text{l mole}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	
Isopropoxy-methyl-phosphoryl fluoride (Sarin)	52	76	60	84	1285	842	6	4.9	25.8	(4)
2-Bromoethoxy-methyl-phosphoryl fluoride	36	38	44	50	1289	849	3	5.0	162	(4)
Isopropoxy-isopropyl-phosphoryl fluoride	63	61	63	91	1258	848	7	5.0	2.03	(4)
Dimethylamido-methyl-phosphoryl fluoride	117	247	120	142	1269	815	13	4.6	1.04	(15)
Bis-dimethylamido-phosphoryl fluoride	217	—	167	196	1258	848	10	5.0	5.7×10^{-5}	(3)
Ethylthio-methyl-phosphoryl fluoride	39	42	39	43	1250	828	9	4.7	1.95×10^4	(15)
Diisopropoxy-phosphoryl fluoride (DFP)	46	78	40	65	1299	865	2	5.2	0.83	(16)
Dimethylamido-ethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun)	41	38	37	54	1272	—	—	—	7.49	(15)

In the second series the concentrations of phenol were 10, 15, 30 and 45 mM in combination with a 15 mM solution of Sarin, and 10, 15, 30 and 60 mM in combination with a 30 mM solution of Sarin. The concentrations of the other phosphorus compounds and of phenol were varied as shown in Table 3. Carbon tetrachloride was used as solvent. The thickness of the cells was 1.0 mm. Preliminary recorded spectra at about 3μ with 0.20 M solution of phenol in both the cells showed that the cells were exactly equivalent. The following settings were used: Resolution 815; response 3:950; gain 6.3; suppression 5; speed about $0.1 \mu/\text{min}$; scale $10 \text{ cm}/\mu$. The same settings were also used in the determination of the standard curve of phenol.

The optical density, D , of the solutions was determined from the recorded curves at the maximum of the sharp absorption band of monomeric phenol at 3610 cm^{-1} (3.77μ). The optical density was corrected for the small background absorptions of the solutes as described by Widom *et al.* (12).

Calibration curve of phenol

The calibration curve of phenol, ranging from 10 to 60 mM phenol in carbon tetrachloride, is given in Fig. 1. Each value is a mean of two to three measurements and the standard deviation was found to be 1.9 %. It appears from the figure that, even at low concentrations, the curve deviates from Beer's law. This deviation is caused by the association of phenol (13)



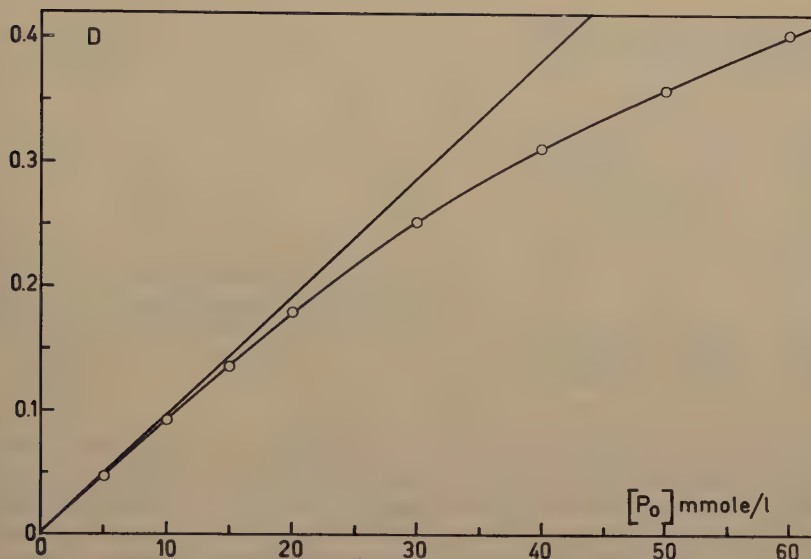


Fig. 1. Calibration curve of phenol in carbon tetrachloride.

In order to determine the molecular extinction coefficient of monomeric phenol at infinite dilution, ε_∞ , let the total concentration of phenol be denoted by $[P_0]$ and the concentration of monomeric phenol by $[P]$. The following expression can then be set up:

$$[P_0] = [P] + 2[P_2] + 3[P_3] + \dots + n[P_n] = P + 2K_2[P]^2 + 3K_2K_3[P]^3 + \dots \quad (1)$$

By the substitution of $[P] = D/\varepsilon_\infty d$, where D is the optical density and d the thickness of the cell, in eqn. (1) one gets:

$$\frac{[P_0]}{D} = \frac{1}{\varepsilon_\infty d} + 2K_2 \frac{D}{\varepsilon_\infty^2 d^2} + 3K_2K_3 \frac{D^2}{\varepsilon_\infty^3 d^3} + \dots \quad (2)$$

By plotting $[P_0]/D$ versus D , $\varepsilon_\infty = 95.2 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was obtained from the intercept of the ordinate of the extrapolated curve. This value is in good agreement with that obtained by Widom *et al.* (12). The hypothetical calibration curve of monomeric phenol based on the extinction coefficient obtained is also given in Fig. 1.

Results and discussion

The ability of Sarin to associate with phenol is illustrated in Fig. 2, where the spectra of the system Sarin-phenol are recorded. It can be seen that, as the concentration of Sarin increases at constant concentration of phenol, the absorption band of the free OH group at 3610 cm^{-1} (2.77μ) decreases, while simultaneously the absorption band of the bonded OH group at about 3300 cm^{-1} (3.0μ) increases.

The frequency shifts of different absorption bands in the spectra of the organic phosphorus compounds caused by association with phenol are exemplified by the

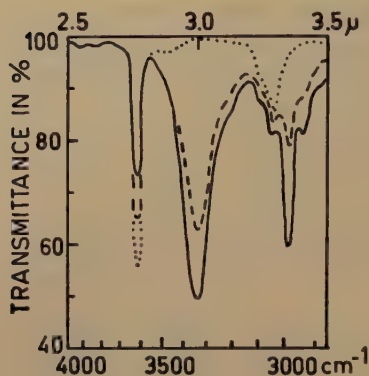


Fig. 2. The variation of the OH band of phenol in consequence of the association with Sarin. 30 mM phenol in carbon tetrachloride; ---- 30 mM phenol + 15 mM Sarin in carbon tetrachloride; — 30 mM phenol + 30 mM Sarin in carbon tetrachloride.

system Sarin-phenol in Fig. 3, where it is shown that the shifts of the P=O band at 1285 cm^{-1} ($7.78\text{ }\mu$) and of the P-F band at 842 cm^{-1} ($11.88\text{ }\mu$) are particularly noticeable. The frequencies of the P=O band and of the P-F band of the compounds studied, as well as the frequency shifts of the P-F band at the association with phenol, are given in Table 3. Owing to the overlapping of the phenol bands at 1256 cm^{-1} and 1218 cm^{-1} the exact shifts of the P=O band were difficult to determine but they were about 20 cm^{-1} . No, or very slight, shifts of the absorption bands attributed to the P-OC and P-NC₂ bonds (14) were observed in the spectra of the complexes. The shifts of the P=O band to lower frequencies, corresponding to a bond weakening, and of the P-F band to higher frequencies, corresponding to a bond strengthening, in the spectra of the complexes indicate that the hydrogen bond is attached to the oxygen atom of the P=O group. These results favour formula (IIIa) as a transition state in the reaction between Sarin and catechols.

For the equilibrium of a 1:1 complex such as



where P, S and PS denote monomeric phenol, Sarin or a related compound, and the complex respectively, the association constant is defined by

$$K_{\text{ass}} = \frac{[PS]}{[P][S]} \quad (3)$$

By the determination of the optical density of the free OH band of a solution containing phenol and phosphorus compound, [P] can be read from the linear curve given in Fig. 1, and the total concentration of phenol not involved in the PS-complex, i.e. $[P] + 2[P_2] + \dots + n[P_n]$ can be read from the calibration curve of phenol given in the same figure. From the latter value one gets $[PS] = [P_0] - ([P] + 2[P_2] + \dots + n[P_n])$ and thus also $[S] = [S_0] - [PS]$.

If equilibrium (V) is the only one which the organophosphorus compounds are engaged in, the association constants should be independent of the concentrations of phenol and phosphorus compounds. However, it appears from Fig. 4, where the association constant of Sarin for two concentrations of Sarin is plotted versus the concentration of phenol, that this is not the case. At higher concentrations of phenol

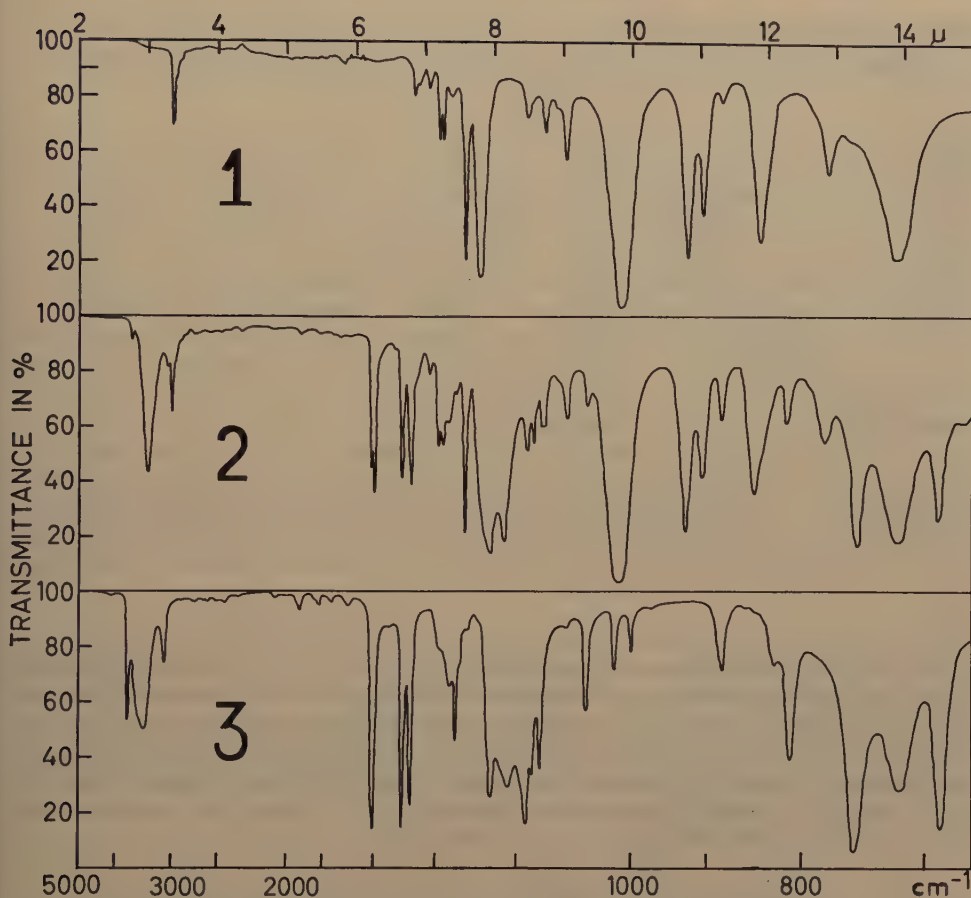


Fig. 3. The infra-red spectra of 0.20 *M* solutions of Sarin (1), Sarin-phenol mixture (2) and phenol (3).

the association constant tends to increase rapidly which indicates that Sarin is also involved in other equilibria, such as



At the lower concentrations the association constant seems to be relatively independent of the concentration.

In Table 3 the association constants of the various phosphorus compounds are given. They are calculated on the assumption that only equilibrium (V) is valid. The reproducibility of the constants is estimated at $\pm 10\%$. Such a large deviation is to be expected for this method of determination, as a small error in the optical density of the OH band will cause a fairly large error in the association constant.

A change from methyl to *isopropyl* in Sarin increases the association constant, which is consistent with the theory of an increasing positive inductive effect (Ingold's

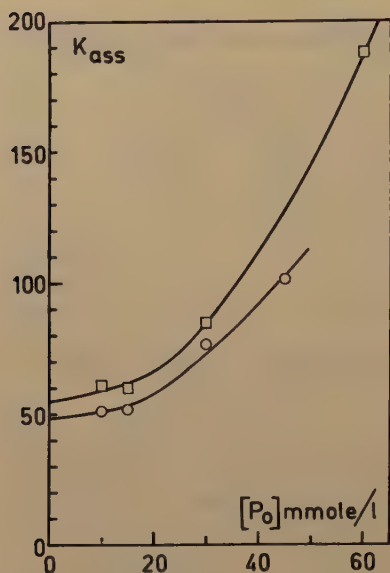
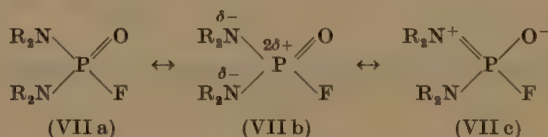
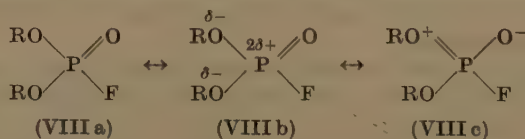


Fig. 4. The association constant of Sarin, 15 mM (O) and 30 mM (□), plotted versus the concentration of phenol.

terminology) when passing from methyl to *isopropyl*. This effect is also reflected in a smaller hydrolytic rate constant as shown from Table 3. Steric effects also probably contribute to this decrease. It is also seen that the negative inductive effect of bromine in the bromoethoxy derivative makes the phosphorus atom more electron deficient and more reactive than in Sarin and simultaneously the oxygen in the P=O group less disposed to complex formation. The great ability of the dimethylamino derivatives to associate with phenol indicates that the mesomeric effect of the nitrogen atom (VIIc) predominates over its inductive effect (VIIb)



which also is reflected in the low reactivity of these compounds. By substituting the methyl group in Sarin for an *isopropoxy* group the association constant decreases, indicating that the inductive effect of the oxygen atom (VIIIb) is predominant. On the basis of such an electron distribution the hydrolytic stability is greater



than expected. It may, however, be due to steric effects of the substituents. A comparison of the force constants of the P-F bond, $k_{\text{P-F}}$, given in Table 3, shows that the force constant of DFP is greater than that of the other compounds, which may

contribute to the smaller reactivity of the P-F bond in DFP. The force constants have been calculated from the expression for a simple harmonic oscillator:

$$k_{\text{P-F}} = 4\pi^2 c^2 \nu_{\text{P-F}}^2 \mu_{\text{P-F}} \quad (4)$$

where $\nu_{\text{P-F}}$ is the frequency in cm^{-1} of the P-F band and $\mu_{\text{P-F}}$ is the reduced mass.

By substitution of the isopropoxy group in Sarin for an ethylthio group an increase in the electronic density of the phosphorus atom and consequently of the oxygen atom would be expected owing to the lower electronegativity of sulphur. As seen from Table 3 the results contradict such an assumption of the electron distribution in ethylthio-methyl-phosphoryl fluoride. The large rate constant may, however, to some extent be ascribed to the ready polarisability of sulphur (17). Moreover, the smaller force constant of the P-F bond may indicate a larger reactivity of this bond in the thio derivative than in the oxygen analogue.

A comparison of the second-order rate constants for the alkaline hydrolysis of the organic phosphorus compounds with their association constants given in Table 3 shows that, with some exceptions, a large rate constant corresponds to a small association constant and vice versa which is consistent with the hypothesis postulated in the introduction. Moreover, the magnitude of the frequency shifts of the P-F band seems approximately to parallel the increase in the association constants.

SUMMARY

The association of phenol with Sarin and seven related compounds has been studied by means of infra-red spectroscopy and the association constants have been determined. It has been shown that phenol associates with the organic phosphorus compounds by a hydrogen bond to the oxygen atom in the P=O group. A hypothesis that the ability of phenol to associate with the compounds goes inversely as their reactivity to nucleophilic agents, has been verified.

ACKNOWLEDGEMENTS

My sincere thanks are due to Professor G. Ljunggren, Director of this Institute, for the kind interest he has shown in this work. The author wishes also to express his sincere thanks to Docent L. Melander, Nobel Institute of Chemistry, for stimulating criticism and discussions.

Research Institute of National Defence, Dept. 1, Sundbyberg 4, Sweden.

REFERENCES

1. DOSTROVSKY, I., and HALMANN, M., *J. Chem. Soc.* 1953, 516.
2. DOSTROVSKY, I., and HALMANN, M., *J. Chem. Soc.* 1956, 1004.
3. HEATH, D. F., *J. Chem. Soc.* 1956, 3796.
4. LARSSON, L., *Acta Chem. Scand.* 11, 1131 (1957).
5. KOSOLAPOFF, G. M., and McCULLOUGH, J. F., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 5392 (1951).
6. HALPERN, E., BOUCK, J., FINEGOLD, H., and GOLDENSON, J., *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4472 (1955).
7. EPSTEIN, J., ROSENBLATT, D. H., and DEMEK, M. M., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 341 (1956).
8. LARSSON, L., *Acta Chem. Scand.* 12, 723 (1958).
9. HOLMSTEDT, B., *Acta Physiol. Scand.* 25, suppl. 90 (1951).
10. SAUNDERS, B. C., and STACEY, G. J., *J. Chem. Soc.* 1948, 695.

L. LARSSON, *The association of phenol with Sarin*

11. KINNEAR, A. M., and PERREN, E. A., J. Chem. Soc. 1952, 3437.
12. WIDOM, J. M., PHILIPPE, R. J., and HOBBS, M. E., J. Am. Chem. Soc. 79, 1383 (1957).
13. KEMPTER, H., and MECKE, R., Z. physik. Chem. B46, 229 (1940).
14. HOLMSTEDT, B., and LARSSON, L., Acta Chem. Scand. 5, 1179 (1951).
15. LARSSON, L., Acta Chem. Scand. 12, 783 (1958).
16. KILPATRICK, M., and KILPATRICK, M. L., J. Phys. & Colloid Chem. 53, 1371 (1949).
17. BRANCH, G. E. K., and CALVIN, M., The Theory of Organic Chemistry. Prentice-Hall, Inc., New York 1945, p. 422.

Tryckt den 24 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

3-Substituted thiophenes

Metalation of methyl 3-thienyl sulphide and methyl 3-thienyl sulphone

By SALO GRONOWITZ

With 12 figures in the text

In connection with work in progress on the metalation of 3-substituted thiophenes with *n*-butyllithium (1), methyl 3-thienyl sulphide and the corresponding sulphone have been prepared and their reaction with *n*-butyllithium investigated.

Methyl 3-thienyl sulphide could not be obtained in good yield from 3-thienyllithium sulphur and methyl iodide by analogy with the preparation in Organic Synthesis (2) of the 2-isomer from 2-thiophene magnesiumbromide sulphur and methyl iodide. This is due to the presence of *n*-butyl bromide (formed through halogen-metal interconversion between *n*-butyllithium and 3-bromothiophene in the preparation of 3-thienyllithium) which alkylates the lithium salt of 3-thiophenethiol simultaneously with the added methyl iodide. Thus a mixture of methyl and *n*-butyl 3-thienyl sulphide was obtained. (The possibility of using methyllithium instead of *n*-butyllithium is not realizable as it is well known that methyllithium undergoes halogen-metal interconversion only very slowly and in low yield (3).) It was however possible to obtain methyl 3-thienyl sulphide in high yield through the reaction of 3-thienyllithium with dimethyl disulphide.

It should perhaps be mentioned that a most convenient method of preparation of methyl 3-thienyl sulphide should be the alkylation of 3-thiophenethiol (4) which is a by-product of the commercial thiophene production. This compound is however not available at the present time.

Methyl 3-thienyl sulphone (m.p. 76–77°) was easily prepared in high yield through standard hydrogen peroxide oxidation of the sulphide in acetic acid solution (5).

The IR-spectra of the isomeric methyl sulphides and methyl sulphones are given in Figs. 1–4. Methyl 3-thienyl sulphide has the strong absorption band at 13.25 μ which is characteristic of 3-substitution in thiophene. In the sulphones, however, both the 2- and 3-isomer have absorption in this region. The absorptions connected with the S=O stretching modes occur according to Schreiber (6) at 1160–1120 cm^{-1} and 1350–1300 cm^{-1} . Both sulphones have a broad strong band at 8.78 μ (1139 cm^{-1}). In the 1300 cm^{-1} region, however, absorption occurs both in the sulphides and sulphones.

The *methyl* sulphide and sulphone were chosen for this investigation as in the methyl group a third metalable hydrogen is introduced and thus some information on the difference in reactivity of the nuclear and lateral hydrogens in thiophene can be obtained.

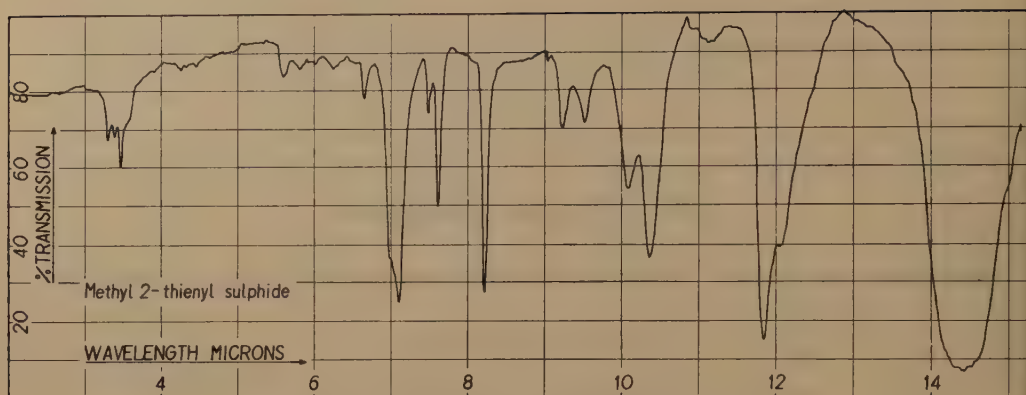


Fig. 1. IR-spectrum of methyl 2-thienyl sulphide.

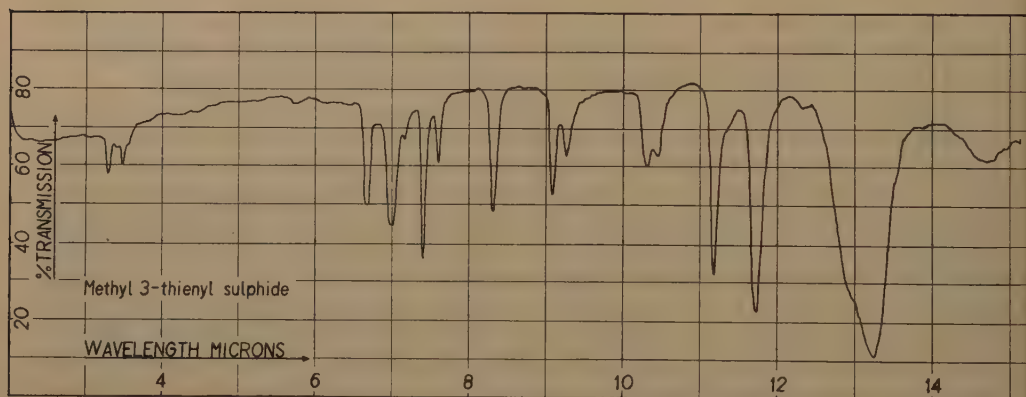


Fig. 2. IR-spectrum of methyl 3-thienyl sulphide.

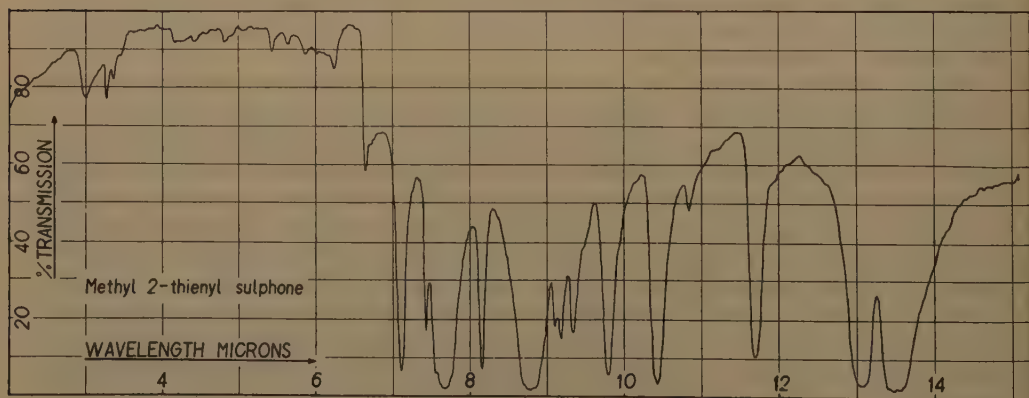


Fig. 3. IR-spectrum of methyl 2-thienyl sulphone.

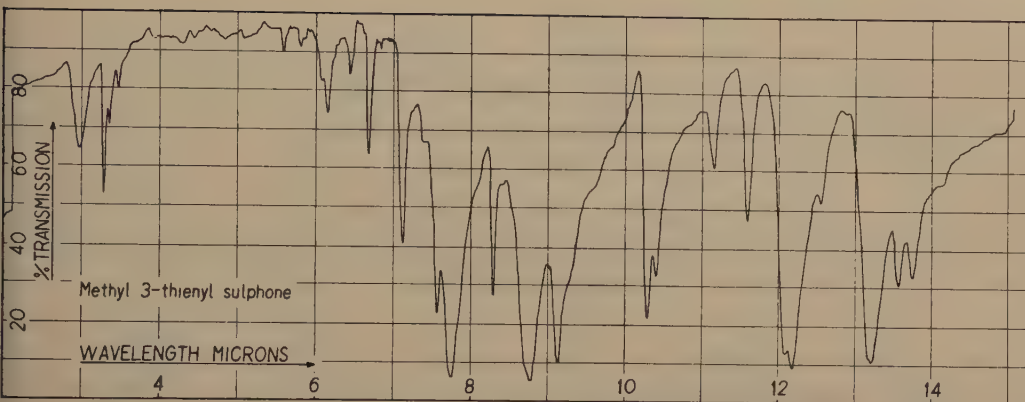


Fig. 4. IR-spectrum of methyl 3-thienyl sulphone.

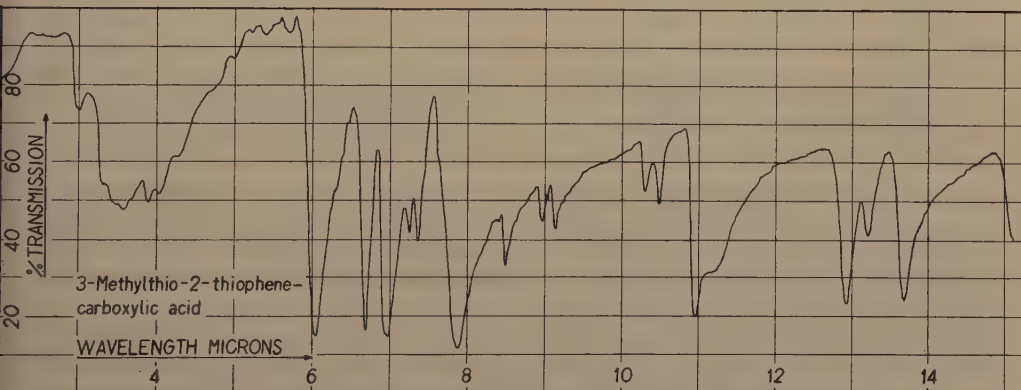


Fig. 5. IR-spectrum of 3-methylthio-2-thiophenecarboxylic acid.

Methyl 3-thienyl sulphide was rapidly metalated by *n*-butyllithium and upon carbonation, an acid m.p. 201–202° (IR-spectrum Fig. 5) which analysed correctly as $C_6H_6O_2S_2$ was obtained in 70 % yield. This acid could not be the known 3-thienyl mercaptoacetic acid m.p. 50.5–51°C (7). Thus nuclear metalation had occurred. It is most probable that analogous to the metalation of 3-methoxythiophene substitution has occurred in the 2-position. There exists, however, a very weak possibility that the larger steric requirements of the $-SCH_3$ group compared with the $-OCH_3$ could, if the metalating agent is sensitive to steric effects, direct substitution to the 5-position. It is in this case not possible to determine the structure of the obtained acid through Raney-Nickel desulphurization as the $-SCH_3$ group also will be removed.

It was, however, possible to obtain convincing evidence that the acid is 3-methylthio-2-thiophenecarboxylic acid through a comparative study of its nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum, and those of 3-methoxy-2-thiophenecarboxylic acid and 3-methoxy-5-thiophenecarboxylic acid (1).

The two properties of NMR-spectra which are of interest for the identification of

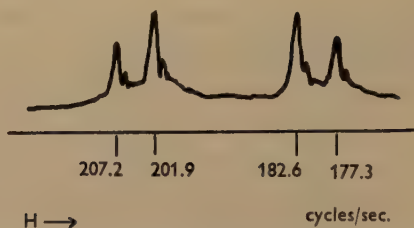


Fig. 6. NMR-spectrum of the ring protons of 3-methoxy-2-thiophenecarboxylic acid in dimethylsulphoxide at 40 Mc/sec.

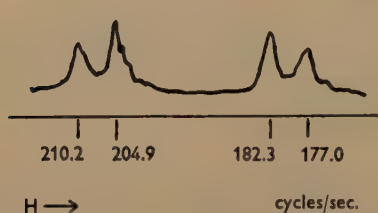


Fig. 7. NMR-spectrum of the ring protons of 3-methylthio-2-thiophenecarboxylic acid in dimethylsulphoxide at 40 Mc/sec.

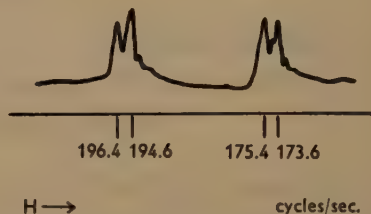


Fig. 8. NMR-spectrum of the ring protons of 3-methoxy-5-thiophenecarboxylic acid in dimethylsulphoxide at 40 Mc/sec.

different series of organic compounds as i.e. the 2,3- and 2,4-disubstituted thiophenes are the chemical shift between the hydrogens and the nuclear spin-spin coupling. The chemical shift, however, is much dependent upon the nature of the substituents, their inductive and mesomeric effects, and can perhaps only be used when the substituents are very similar. The spin-spin interaction on the contrary, as Glick and Bothner-By (8) have found, only changed very slightly with the introduction of a nonmagnetically active substituent. Gutowsky *et al.* (9) have found the spin-spin coupling constants for the ortho, meta and para hydrogens in benzenes to be 7.9, 2.1 and 0.5 c.p.s.

It has now been found that the spin-spin coupling constant in 3-methoxy-2-thiophenecarboxylic acid is 5.3 c.p.s. and in 3-methoxy-5-thiophenecarboxylic acid 1.8 c.p.s. In the 3-methylthio-thiophenecarboxylic acid the spin-spin coupling constant was 5.3 c.p.s., which identifies the acid obtained on metalation of methyl 3-thienyl sulphide as 3-methylthio-2-thiophenecarboxylic acid. The same magnitude of spin-spin coupling has been found by Hoffman and the present author (10) for other 2,3- and 2,4-disubstituted thiophenes. The spectra were recorded in dimethyl sulphoxide, which was the only solvent in which the 2,3-substituted acids were soluble enough. The spectra are given in Figs. 6-8. The shifts are reported in p.p.m. relatively to the solvent resonance and computed with the following sign convention:

$$\delta = \frac{H_r - H_s}{H_r} \cdot 10^6 = \frac{\nu}{40},$$

where H_s is the field in gauss of the sample, H the field necessary for the reference in this case dimethyl sulphoxide, and ν is the shift in c.p.s. from the reference compound.

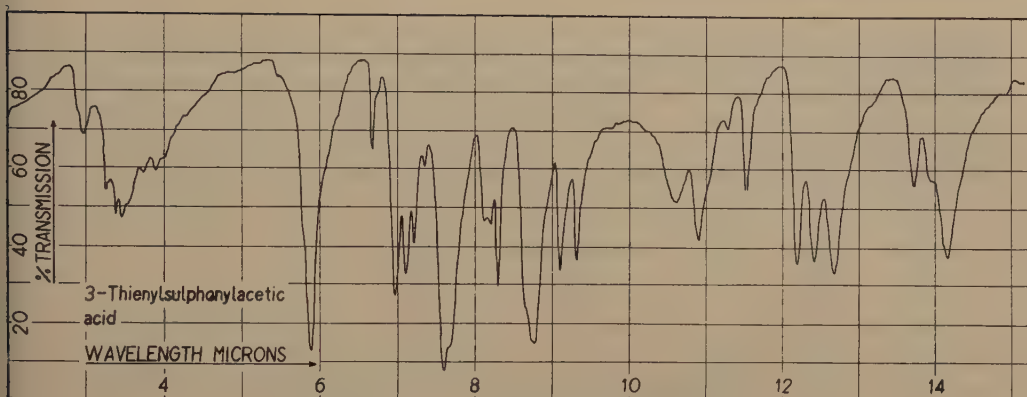


Fig. 9. IR-spectrum of 3-thienylsulphonylacetic acid.

The two aromatic hydrogen resonances are in 3-methoxy-2-thiophenecarboxylic acid centered at 4.5 and 5.1 p.p.m., in 3-methylthio-2-thiophenecarboxylic acid at 4.5 and 5.2 p.p.m. and in 3-methoxy-5-thiophenecarboxylic acid at 4.3 and 4.9 p.p.m. Thus also the chemical shifts give indications in the same direction.

On metalation of methyl 3-thienyl sulphone, an acid m.p. 117–118° (IR-spectrum Fig. 9) was obtained in 61 % yield upon carbonation. Analyses showed it to have the formula $C_6H_6O_4S_2$. The similarity of its UV-spectrum with that of methyl 3-thienyl sulphone (Fig. 10) indicated that lateral metalation had occurred and that the carboxyl group was not in conjugation with the aromatic ring.

Convincing evidence that lateral metalation had occurred and hence that the acid formed was 3-thienyl sulphonylacetic acid was again obtained from its NMR-spectrum. The acid in 50 % acetone solution gave four peaks (Fig. 11) with the signal ratio 1:1:2:2 besides the peak from acetone. The resonances occurred at 8.6, 6.3, 5.5 and 2.3 p.p.m. relative to the acetone resonance. At high resolution the peaks at 8.6 p.p.m. and 2.3 p.p.m. are singlets and the peak at 6.3 p.p.m. quadruplet and at 5.5 p.p.m. a complex multiplet. The fields of resonance, the signal ratios, as well as the fine structure of the peaks are in accordance only with the following assignments. The peak at 8.6 p.p.m. is that of the carboxyl hydrogen, the peaks at 6.3 and 5.5 p.p.m. are those of the three ring hydrogens, and the peak at 2.2 p.p.m. is that of the hydrogens in the methylene group in 3-thienyl sulphonylacetic acid. The resonance of the methylene hydrogens is shifted to lower applied field compared with "normal" methylene hydrogens, as for instance in cyclohexane, because of the considerable electron withdrawing influence of the adjacent sulphonyl and carboxyl groups, which unshields the $-CH_2$ hydrogens making them acidic. This acidity was also noticed in another way when the NMR spectrum was recorded in deuterium oxide solution (Fig. 12). A simple spectrum was obtained, which besides the water resonance had two peaks with the signal ratio 1:2, which can be ascribed to the three aromatic hydrogens. Thus, in deuterium oxide not only the carboxyl hydrogen but also the weakly acidic methylene hydrogens are exchanged for deuterium, which is also evident from the intensity of the water resonance. The spectrum obtained cannot be interpreted as that of a 3-methylsulphonylthienoic acid. For such a compound, four peaks with signal ratio 1:1:1:3, or if the resonances of the two ring hydrogens are not resolved 1:2:3 has to be expected.

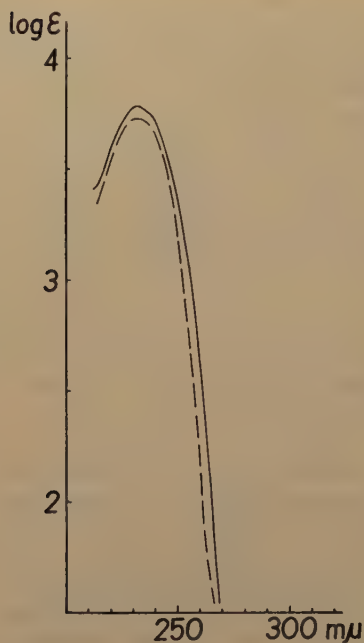


Fig. 10. UV-spectra of — 3-thienylsulphonylacetic acid ---- methyl 3-thienyl sulphone.

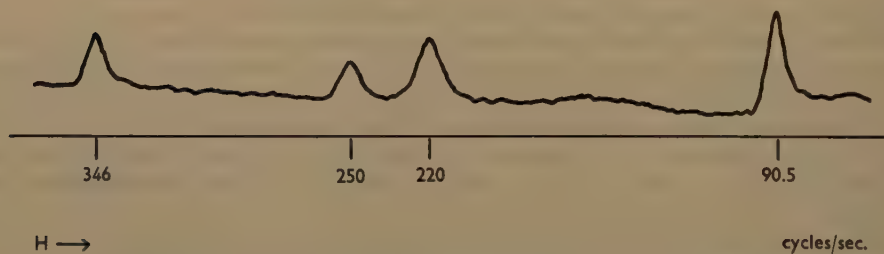


Fig. 11. NMR-spectrum of 3-thienylsulphonylacetic acid in acetone at 40 Mc/sec.

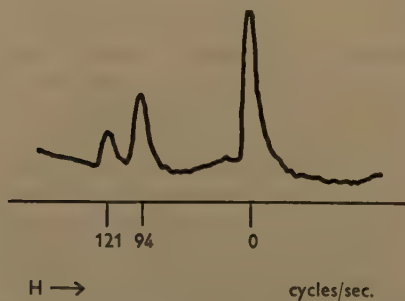
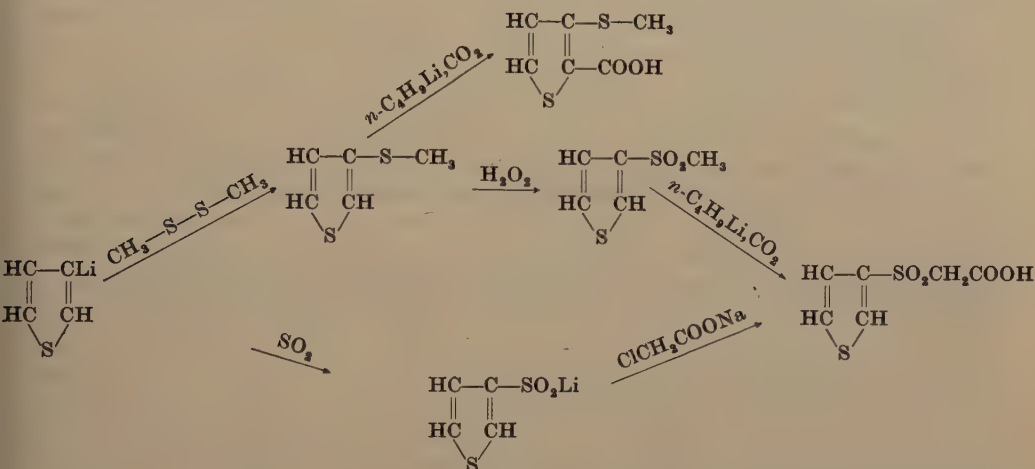


Fig. 12. NMR-spectrum of 3-thienylsulphonylacetic acid in deuterium oxide at 40 Mc/sec.

The structure of the acid obtained in metalation of methyl 3-thienyl sulphone could be established through the following independent synthesis. 3-Thienyllithium was sulphonated with SO_2 and the sodium salt of the 3-thienylsulphinic acid thus obtained was reacted with sodium chloroacetate in water, which gave 3-thienyl sulphonylactic acid in good yield, which was identical with the acid obtained on metalation of methyl 3-thienyl sulphone. A survey of the different reactions are given in the following formulas.



It is very interesting to compare the different 3-substituted thiophenes and the corresponding benzene derivatives reaction with *n*-butyllithium. In methyl 3-thienyl sulphide the 2-hydrogen is still the most reactive "acidic" one and metalation with *n*-butyllithium occurs in the ring, contrary to thioanisole which is metalated in the side-chain by *n*-butyllithium in ether (11). It should, however, be noted that with ethyl magnesiumbromide nuclear metalation is obtained (12). If the acidity of the methyl group is increased by oxidizing the sulphide to sulphone, the reactivity of the side-chain becomes larger than that of the nuclear hydrogens in methyl 3-thienyl sulphone. Methylphenyl sulphones are, as is well known, acidic compounds which are rapidly metalated in ether, also by weak metalating agent, such as ethyl magnesium bromide.

It should be interesting in this connection to investigate the behaviour of the corresponding sulfoxide. In this case however complications can be expected as Gilman and Esmay (13) have found that dibenzothiophene-5-oxide undergoes reductive metalation with *n*-butyllithium to give dibenzothiophene-4-carboxylic acid on carbonation. In this paper references to earlier work on the reaction of sulfoxides with metal-organic compounds can be found.

Experimental

Methyl 3-thienyl sulphide

A solution of 3-thienyllithium (14) prepared as before from 34.0 g (0.208 moles) of 3-bromothiophene and 163 ml 1.30-N *n*-butyllithium at -70° was forced with nitrogen into a stirred solution of 19.9 g (0.212 moles) of dimethyl disulphide in 100 ml

S. GRONOWITZ, 3-Substituted thiophenes

of ether, whereupon a white precipitate immediately formed. The mixture was stirred for three hours and then hydrolyzed with water. The ether phase was washed with dilute sodium hydroxide solution and water, dried over calcium chloride and fractionated. 23 g (85 %) of methyl 3-thienyl sulphide b.p. 93–94°/30 mm Hg, $n_D^{25} = 1.6029$ was obtained.

Anal. $C_5H_6S_2$ (130.2)
calc. C 46.14 H 4.65
found C 45.97 H 4.65

Methyl 3-thienyl sulphone

8.3 g of methyl 3-thienyl sulphide in 100 ml of acetic acid and 25 ml 30 % hydrogen peroxide solution was heated on the steam bath for 90 minutes. The cooled solution was poured on ice and under external cooling and stirring made alkaline with strong sodium hydroxide solution. This solution was extracted with ether. The combined ether phases were dried and the ether distilled off, leaving 8.8 g (84 %) of methyl 3-thienyl sulphone. After one recrystallization from aqueous methanol, from which the sulphone crystallized in white plates 7.9 g, m.p. 76–77° was obtained.

Anal. $C_5H_6O_2S_2$ (162.2)
calc. C 37.02 H 3.73 S 39.53
found C 37.20 H 3.72 S 39.30

Attempted preparation of methyl 3-thienyl sulphide

To a solution of 3-thienyllithium prepared in the usual manner at -70°C from 24.4 g (0.150 moles) of 3-bromothiophene and 145 ml 1.1-N *n*-butyllithium was added 4.8 g (0.150 moles) of powdered sulphur. When the temperature had risen to 0°C , 28.4 g (0.20 moles) of methyl iodide was added drop-wise and the mixture refluxed for ten hours. The reaction product was then worked up as described by Cymerman-Craig and Loder (2). Upon fractionation, 8.0 g of one fraction b.p. 102–110°/30 mm Hg $n_D^{25} = 1.5919$ and 11.1 g of another fraction b.p. 137–150°/30 mm Hg $n_D^{25} = 1.5638$ were obtained. Analyses indicated that the first fraction was impure methyl 3-thienyl sulphide. Upon oxidation with hydrogen peroxide pure methyl 3-thienyl sulphone was obtained. Analyses indicated the second fraction to be impure *n*-butyl 3-thienyl sulphide.

Metalation of methyl 3-thienyl sulphide

To 6.3 g (0.0485) moles of methyl 3-thienyl sulphide in 50 ml of absolute ether in the usual four-necked flask equipped with stirrer, reflux condensor with calcium chloride tube dropping funnel and nitrogen inlet, 67 ml 0.72-N *n*-butyllithium solution was added drop-wise and the mixture refluxed for 30 minutes. The solution was then poured on a mixture of Dry Ice and ether. When the temperature had risen to -10° the mixture was hydrolyzed with water. The ether phase was extracted once with sodium bicarbonate solution. The combined aqueous phase were acidified with 2-N hydrochloric acid, precipitating 5.9 g (70 %) of 3-methylthio-2-thiophenecarboxylic acid. After one recrystallization from 50 % ethanol from which the acid crystallized in white needles 5.1 g, m.p. 201–202°, was obtained.

Anal. $C_6H_6O_2S_2$ (174.2)

calc. Equiv. wt. 174.2 C 41.35 H 3.47 S 36.80

found Equiv. wt. 173.5 C 41.32 H 3.42 S 36.66

Metalation of methyl 3-thienyl sulphone

4.0 g (0.0247 moles) methyl 3-thienyl sulphone were reacted with 34 ml 0.72-N *n*-butyllithium in the same manner as described above. Upon acidification no precipitation occurred, so the water phase was extracted with ether. After removal of the ether the residue was recrystallized from large volumes of toluene giving 3.1 g (61 %) of 3-thienylsulphonylacetic acid m.p. 117–118°, which crystallized in white flakes.

Anal. $C_6H_6O_4S_2$ (206.2)

calc. Equiv. wt. 206.2 C 34.94 H 2.93 S 31.09

found Equiv. wt. 205.0 C 35.11 H 2.92 S 30.95

3-Thienylsulphinic acid

To a solution of 3-thienyllithium prepared from 42 g (0.258 moles) of 3-bromothiophene and 220 ml 1.2-N *n*-butyllithium at -70°C , was added drop-wise a solution of 20 g of sulphur dioxide in 100 ml of ether. After 30 minutes the heavy white precipitate which formed was separated with centrifuging, carefully washed with ether and dried in a vacuum desiccator. 36 g (90 %) of crude lithium salt was obtained, 20 g of this salt was dissolved in water and under cooling carefully acidified with 2-N hydrochloric acid and the 3-thienylsulphinic acid extracted with ether. The ether phase was dried and after removal of the ether 15.6 g (82 %) of crude 3-thienylsulphinic acid m.p. 55–63° was obtained.

3-Thienylsulphonylacetic acid

6.6 g (0.044 moles) crude 3-thienylsulphinic acid dissolved in 100 ml water and 4.2 g (0.044 moles) chloroacetic acid in 25 ml of water were exactly neutralized with 2-N sodium hydroxide solution. The combined solutions were evaporated on a hot plate until crystallization started and then on a steam bath almost to dryness (six hours). The white crystal mass was dissolved in water, made slightly alkaline and extracted with ether to remove possible non-acidic products. The water phase was acidified and extracted with ether. After evaporation of the ether, 5.9 g (64 %) of acid was obtained. After one recrystallization from toluene, 5.1 g of 3-thienylsulphonylacetic acid m.p. 117–118° was obtained, which gave no melting-point depression and had the same IR-spectrum as the acid obtained upon metalation of methyl 3-thienyl sulphone.

IR- and UV-spectra were obtained as described earlier (15).

The proton magnetic resonance spectra were obtained with a Varian model 4300 spectrometer operating at 40 Mc/s and equipped with a 12" V 4021-HR magnet from the same company and field stabilizer. The separation of lines was measured by the modulation side-band technique with a modulation frequency of 50 c/s, which was obtained from the power line.

SUMMARY

Methyl 3-thienyl sulphide and methyl 3-thienyl sulphone have been prepared. The sulphide is metalated by *n*-butyllithium in the 2-position whereas the sulphone is metalated in the methyl group. Nuclear magnetic resonance spectra have been used for the determination of the structure of the compounds obtained in metalation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is greatly indebted to Professor Arne Fredga for valuable discussions. Thanks are also due to the head of this institute, Professor Nils Hellström, for his kind interest and for all facilities put at the author's disposal. I am also indebted to Dr. Ragnar Hoffman for taking the nuclear magnetic resonance spectra and for his expert advice in connection with them. The infrared spectra were determined by Mr Stig Bergvall and the microanalyses by Dr. A. Bengtsson of the Analytical Department of the Chemical Institute, University of Uppsala.

Institute of Organic Chemistry, Royal Agricultural College, Uppsala, July 1958.

REFERENCES

1. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* 12, 239 (1958).
2. CYMERMAN-CRAIG, J., and LODER, J. W., *Org. Syntheses* 35, 85 (1955).
3. LANGHAM, W., BREWSTER, R. Q., and GILMAN, H., *J. Am. Chem. Soc.* 63, 545 (1941).
4. CAESAR, P. D., and BRANTON, P. D., *Ind. Eng. Chem.* 44, 122 (1952).
5. ZINCKE, T., and BRUNE, R., *Ber.* 44, 185 (1911).
6. SCHREIBER, K. C., *Anal. Chem.* 21, 1168 (1949).
7. CHALLENGER, F., MILLER, S. A., and GIBSON, G. M., *J. Chem. Soc.* 1948, 769.
8. GLICK, R. E., and BOTHNER-BY, A. A., *J. Chem. Phys.* 25, 362 (1956).
9. GUTOWSKY, H. S., HOLM, C. H., SAIKA, A., and WILLIAMS, G. A., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4596 (1957).
10. HOFFMAN, R., and GRONOWITZ, S. To be published.
11. GILMAN, H., and WEBB, F. J., *J. Am. Chem. Soc.* 62, 987 (1940).
12. GILMAN, H., and WEBB, F. J., *J. Am. Chem. Soc.* 71, 4062 (1949).
13. GILMAN, H., and ESMAY, D. L., *J. Am. Chem. Soc.* 74, 266 (1952).
14. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* 7, 361 (1954).
15. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* 13, 87 (1958).

Tryckt den 24 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Proton magnetic resonance of thiophenes. I

Monosubstituted thiophenes

By SALO GRONOWITZ and RAGNAR A. HOFFMAN

With 12 figures in the text

Theoretical (1) and experimental (2) investigations show that the chemical shifts observed in proton magnetic resonances due to diamagnetic shielding of the nucleus are connected with differences in the electron distribution about chemically non-equivalent protons. It is clear that this diamagnetic screening of the proton from the external field is accomplished not only by the binding electrons, but also by electrons of neighbouring atoms. In aromatic compounds, however, the protons for which the shieldings are measured are always bonded to carbon, and the substituted group is so far away that it seems very probable that only the electron-attracting or repelling power of the substituent is of any importance. The chemical shifts in the nuclear magnetic resonance (NMR) spectra are thus a qualitative measure of electronic differences in the normal state of molecules and as such should be related to chemical reactivity. It should however be pointed out that relative electron densities as obtained from chemical reactivity data (Hammett's σ -values) also depend upon electronic interactions in the transition state and thus involve the polarizabilities of the substituents, since the course of any reaction depends in principle upon the normal electronic states of the reactants and the various electronic interactions in the transition state. Through NMR it is thus possible to study directly the effects of a substituent on the normal state of the molecule, as compared for instance with UV-spectroscopy, where only the differences of the effect on the excited and ground states can be found.

Thus, although no general connection between kinetic data and the chemical shifts in NMR might be expected, Gutowsky et al. (3) in an investigation of fluorine magnetic resonances of substituted fluorobenzenes and Corio and Dailey (4) in an investigation of the proton magnetic resonances in monosubstituted benzenes found rather good agreement between the relative electron-densities obtained from the chemical shifts in the NMR spectra and those obtained from chemical data, especially for strong ortho-para or strong meta-directing substituents. Corio and Dailey also obtained large differences between the chemical shifts and σ -values for such substituents whose directing effect in substitution reactions is known to be due to polarization, such as the halogens.

An inherent difficulty in the experiments on substituted benzenes is the complexity of the spectra obtained. Thus a monosubstituted benzene is a five-spin system of

the type AB_2C_2 (or in fortunate cases AB_2X_2) in the terminology of Bernstein, Pople and Schneider (5). For such a spin system the number of allowed transitions is 110, 42 of which are combination transitions with weak intensities leaving 68 resonance peaks to be observed in the well resolved spectrum (6). In nearly all cases studied, these peaks are not enough separated to allow a detailed assignment of the various lines to specified transitions and the chemical shifts cannot be measured very accurately.

From a five-membered ring like thiophene on the other hand one obtains upon substitution a three-spin system giving a NMR spectrum of 12 lines which in several cases are well enough separated (at 40 Mc/s) to allow a detailed treatment giving internal chemical shifts with accuracies better than 1 c/s.

In order to throw some light on the effect of substituents on the electron distribution in thiophenes, and differences between 2- and 3-substituted thiophenes and the corresponding benzenes, we have studied the NMR spectra of several monosubstituted thiophenes. Compounds with strong electron-attracting groups ($-I-M$ substituents) such as $-NO_2$, $-CHO$, $-COCH_3$, $-SO_2CH_3$ as well as strong electron-donating groups ($-I+M$ substituents) such as $-OCH_3$, $-SCH_3$, and also compounds with weakly directing groups such as alkyl ($+I$) or halogens ($-I+M$). The compounds were studied in cyclohexane solution except the methylsulphones and carboxylic acids which were not soluble enough and were therefore measured in acetone. Control experiments with some of the other compounds in both solvents showed good additivity of the shifts in these two solvents. Cyclohexane is particularly suitable as a solvent and internal standard for NMR-work on aromatic compounds (7), because the shifts are not concentration dependent in this solvent, and no other anomalous solvent effects (8) occur. The shifts are given relative to cyclohexane in c.p.s. and are calculated with the following sign convention:

$$\delta = \frac{H_r - H_s}{H_r} \cdot 10^6 = \frac{\nu}{40}$$

where H_s is the field of resonance for the sample, H_r the field necessary for the reference, in this case cyclohexane, and ν is the shift in cycles/sec from the reference compound.

In order to discuss the influence of substituents, the shifts relative to thiophene itself are the most interesting. The NMR spectrum of thiophene could, however, not be resolved at 40 Mc/s but appeared as a complex multiplet about 18 c.p.s. broad. This is contrary to the behaviour of furan and pyrrole. In these compounds (9) the resonances of the α - and β -hydrogens are well separated and the shifts are 42 c.p.s. and 26 c.p.s. respectively at 40 Mc/s. This gives additional evidence of the greater similarity of thiophene with benzene compared with the other heterocyclics. In order to obtain some idea of the magnitude of the shift between the α - and β -hydrogens we studied the NMR-spectra of 2,5- and 3,4-dibromothiophene in cyclohexane. Resonances occurred at +211 c.p.s. and +230 c.p.s. respectively, giving a shift of 19 c.p.s. As in the furans the resonance of the α -hydrogens appears at lower applied field, in agreement with the notion that the electron-attracting sulphur atom unshields the α -hydrogens more than the β -hydrogens. It is of course clear that the fields of resonances in the two disubstituted bromothiophenes are not equal to those of the hydrogens in thiophene. The bromo atoms, however, usually cause only small shifts depending upon their opposite inductive and conjugative effects. In any case

Table 1. Nuclear magnetic resonance characteristics of 2-substituted thiophenes.

Substituents	Shifts in c.p.s. relative cyclohexane			Shifts in p.p.m. relative 2,5-and 3,4-dibromo- thiophene resp.			Shifts in p.p.m. for ben- zene analog relative ben- zene		
	hydrogen 3	hydrogen 4	hydrogen 5	δ_3	δ_4	δ_5	ortho	meta	para
-NO ₂	258	227	246	+ 1.18	+ 0.40	+ 0.40	+ 0.97	+ 0.30	+ 0.42
-OCH ₃	187	206	199	- 0.60	- 0.12	- 0.78	- 0.23	- 0.23	- 0.23
-COCH ₃	248	226	248	+ 0.92	+ 0.38	+ 0.45	+ 0.63	+ 0.27	+ 0.27
-CHO	254	228	254	+ 1.08	+ 0.43	+ 0.60	+ 0.73	+ 0.23	+ 0.37
-COOH	251	227	251	+ 1.00	+ 0.40	+ 0.52	+ 0.63	+ 0.10	+ 0.17
-SO ₂ CH ₃	254	229	254	+ 1.08	+ 0.45	+ 0.60	-	-	-

Table 2. Nuclear magnetic resonance characteristic of 3-substituted thiophenes.

Substituents	Shifts in c.p.s. relative cyclohexane			Shifts in p.p.m. relative 2,5- and 3,4-dibromothiophene resp.		
	hydrogen 2	hydrogen 4	hydrogen 5	δ_2	δ_4	δ_5
-COCH ₃	276	252	244	+ 1.15	+ 1.02	+ 0.35
-SO ₂ CH ₃	269	240	245	+ 0.98	+ 0.73	+ 0.38
-OCH ₃	185	209	220	- 1.13	- 0.05	- 0.25
-SCH ₃	217	217	228	- 0.33	+ 0.15	- 0.05
-COOH	270	240	240	+ 1.00	+ 0.72	+ 0.25
-CHO	269	246	246	+ 0.98	+ 0.88	+ 0.40
-CH ₃	210	210	220	- 0.50	- 0.02	- 0.25

Table 3. Chemical shifts in nonresolved NMR-spectra of monosubstituted thiophenes.

Compound	Shifts in c.p.s. relative cyclohexane ¹	
Thiophene	220 ⁴	
2-Chlorothiophene	212 ³	
2-Bromothiophene	219 ³	210 ¹
2-Iodothiophene	207 ³	224 ¹
2-Methylthiophene	210 ³	
Methyl 2-thienyl sulphide	218 ³	
3-Bromothiophene	223 ³	

¹ The superscripts denote the number of protons giving the band ($\approx$ relative intensity).

Table 4. Observed spin-spin splittings in 2-substituted thiophenes.

Substituents	Hydrogen 3		Hydrogen 4		Hydrogen 5	
	J ₃₄	J ₃₅	J ₃₄	J ₄₅	J ₃₅	J ₄₅
-NO ₂	3.8	1.5	3.8	5.2	1.6	5.4
-OCH ₃	3.7	1.8	3.7	6.0	1.7	5.2
-SO ₂ CH ₃	—	—	3.9	4.7	—	—
-COCH ₃	—	—	3.7	5.1	—	—
-CHO	—	—	3.7	5.0	—	—
-COOH	—	—	3.5	4.9	—	—

Table 5. Observed spin-spin splittings in 3-substituted thiophenes.

Substituents	Hydrogen 2		Hydrogen 4		Hydrogen 5	
	J ₂₅	J ₂₄ = J ₃₅	J ₃₅	J ₄₅	J ₄₅	J ₂₅
-COCH ₃	2.7	1.4	1.4	5.1	5.1	2.7
-SO ₂ CH ₃	2.8	1.4	1.5	4.8	5.0	3.0
-OCH ₃	3.1	1.6	1.5	5.0	5.0	3.0
-CHO	2.4	1.5	—	—	—	—
-CH ₃	—	—	—	—	4.7	2.4
-SCH ₃	—	—	—	—	5.2	2.8

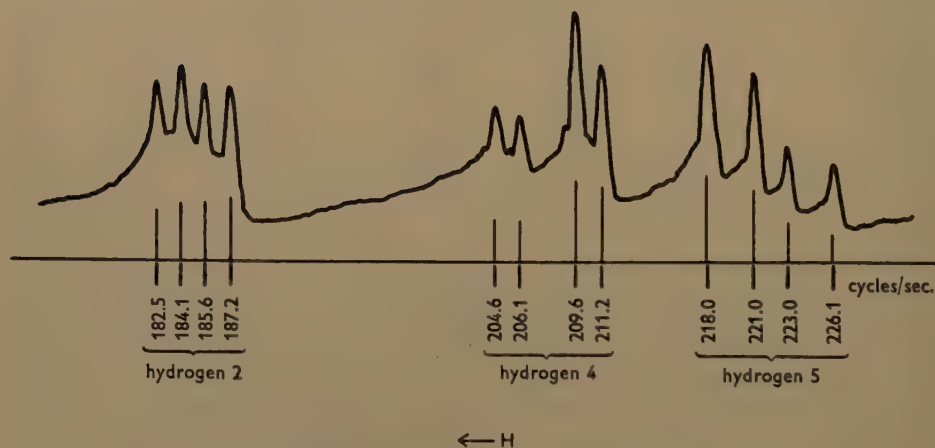


Fig. 1. NMR-spectrum of ring protons of 3-methoxythiophene at 40 Mc/s.

if to a first approximation the effects of the bromines in the 3,4-positions on the 2,5-hydrogens are assumed to be equal to those of the 2,5-positions on the 3,4-hydrogens, the difference between the resonances should give an estimate of the difference in thiophene.

It is hoped that a study with deuterated thiophenes will solve this problem completely.

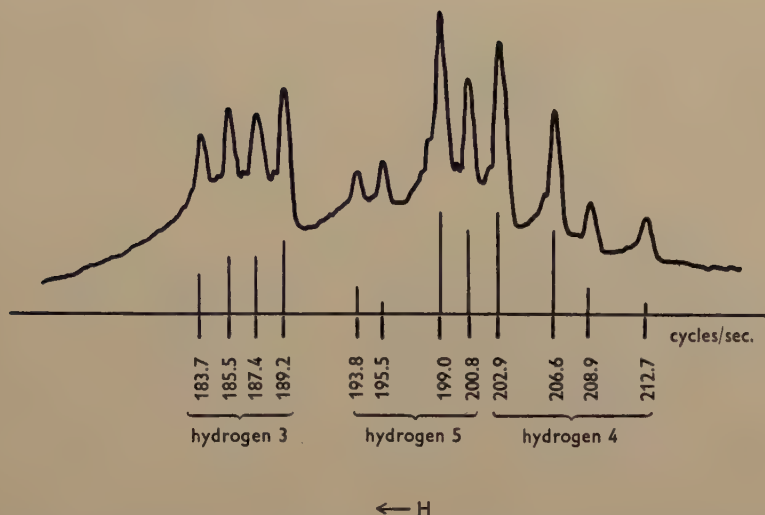


Fig. 2. NMR-spectrum of ring protons of 2-methoxythiophene at 40 Mc/s.

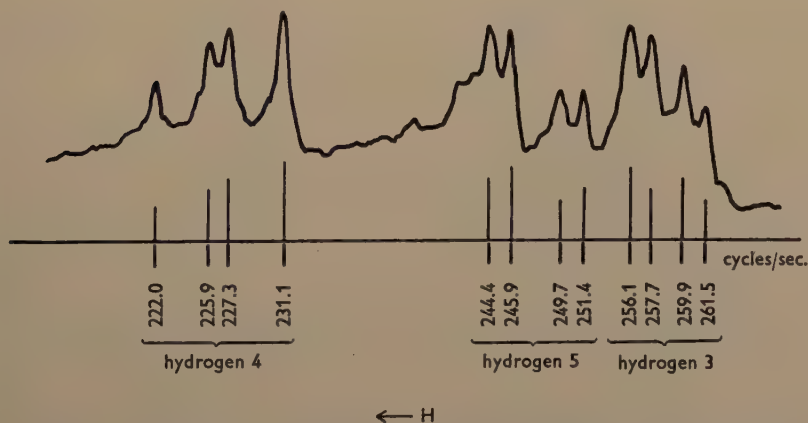


Fig. 3. NMR-spectrum of ring protons of 2-nitrothiophene at 40 Mc/s.

In this connection it should perhaps be mentioned that thiophene and still better furan illustrate the difference between the electron density as measured through NMR and chemical reactivity. Both electrophilic and nucleophilic substitutions in furan and thiophene occur as is well known almost exclusively in position 2, although NMR data indicate that the relative electron density is higher in position 3.¹ This stresses the overwhelming importance of the electronic interactions in the transition states of chemical reactions.

¹ Recent MO-calculations (29) are in accordance with this result.

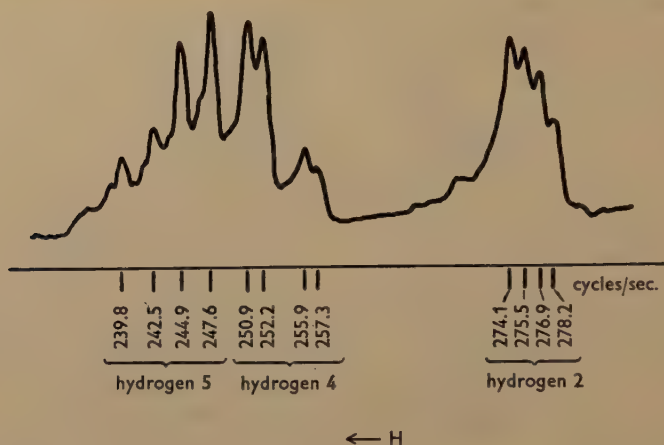


Fig. 4. NMR-spectrum of ring protons of 3-acetothienone at 40 Mc/s.

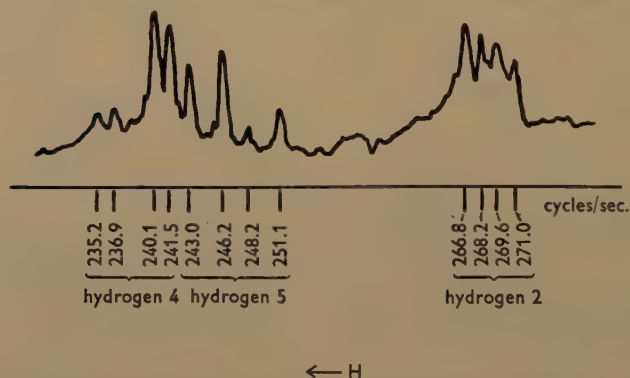


Fig. 5. NMR-spectrum of ring protons of methyl 3-thienyl sulphone at 40 Mc/s.

The resonance spectra obtained were all of the ABC or ABX-type except that from thiophene itself which was of the A_2B_2 type, using the terminology of reference (5). The observed transition frequencies in the spectra of 3-methoxythiophene, 2-methoxythiophene and 2-nitrothiophene are compared with those obtained by inserting the chemical shifts and (averaged) spin-spin coupling constants from Tables 1-2 and 4-5 into the well known Hamiltonian and carrying the perturbation calculation to second order (10). The intensity calculations were only carried to first order. This is shown in Figs. 1-3, where calculated lines with intensities are given together with the obtained spectra.

In the spectra from the above-mentioned compounds and in those from 3-acetothienone and methyl 3-thienylsulphone, the resonance lines form three rather distinct groups (Figs. 1-5). This makes possible an assignment of each one of the various groups of lines to one of the three protons, and the fortunate fact that all the four

spin-spin coupling constants J_{23} , J_{24} , J_{25} and J_{34} are clearly different makes the identification of the proton giving rise to any one of the groups of lines possible. For aromatic (11) as well as aliphatic (12) compounds, investigators find only very slight changes in the coupling constants of a molecule upon alteration of nonmagnetic substituents. This observation is verified by the present work, Tables 4–5, and also by NMR examinations on disubstituted thiophenes (13). The values obtained are $J_{23} = 5.4 \pm 0.6$ c/s; $J_{34} = 3.8 \pm 0.3$ c/s; $J_{25} = 2.7 \pm 0.4$ c/s; $J_{35} = 1.6 \pm 0.3$ c/s (maximum errors).

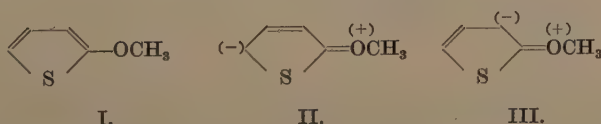
Several other compounds gave spectra with two groups of lines originating from one and two protons respectively. The splittings measured on the resonance lines of the single proton are not equal to the spin-spin coupling constants but in most cases very nearly so (5, 10), and thus make a tentative assignment possible also for these compounds (Figs. 6–8). In some cases finally, all three groups merge to form a complex multiplet, making any direct assignment impossible (Figs. 9–12).

In Tables 1 and 2 are given the chemical shifts for those compounds for which assignments of the hydrogens could be made. The shifts of α -hydrogens relative to the resonance of 3,4-dibromothiophene and of β -hydrogens relative to 2,5-dibromothiophene in p.p.m. are also given. For the sake of clarity it should be stated that wherever the symbol δ is used in this paper, the reference for 2- or 5-hydrogens and for 3- or 4-hydrogens are the resonance positions in the 3,4- and 2,5-dibromothiophenes, that is $+211$ and $+230$ c/s from cyclohexane. For comparison, the shifts obtained by Corio and Dailey for substituted benzenes rel. to benzene are also given. With the sign convention chosen, a positive δ -value means that resonance occurs at lower applied field than in the reference, showing that the proton is less diamagnetically shielded and indicating electron-attracting properties in the substituent and vice versa.

Where only one assigned proton is obtained, the center of gravity of the band of the two others is given for both of them. In Table 3 the center of the unresolved non-assignable spectra are given in c.p.s. The general form of this type of spectra is obvious from the spectra of thiophene and methyl 2-thienyl sulphide and 2-chlorothiophene (Figs. 9–12).

Through the analyses of the spin-spin couplings it has thus been possible to make definite assignments of the hydrogens in some substituted thiophenes, enabling us to study the influence of substituents on the electronic structure of thiophenes as expressed in the chemical shifts.

The methoxyl group is of the $(-I+M)$ type, i.e. it is inductive electron-attracting but conjugative electron-donating. The following valence forms have been assumed (14) to contribute to the structure of 2-methoxythiophene.



The resonances of all three protons occur at higher field than in thiophene, giving evidence of the shielding (electron-donating effect of the substituent). The largest shift to higher field is thus obtained for position 5 ($\delta = -0.78$ p.p.m.), where through the conjugative effect the relative electron-density is highest. In position 3, the conjugative effect is counteracted by the inductive electron-attracting effect, and

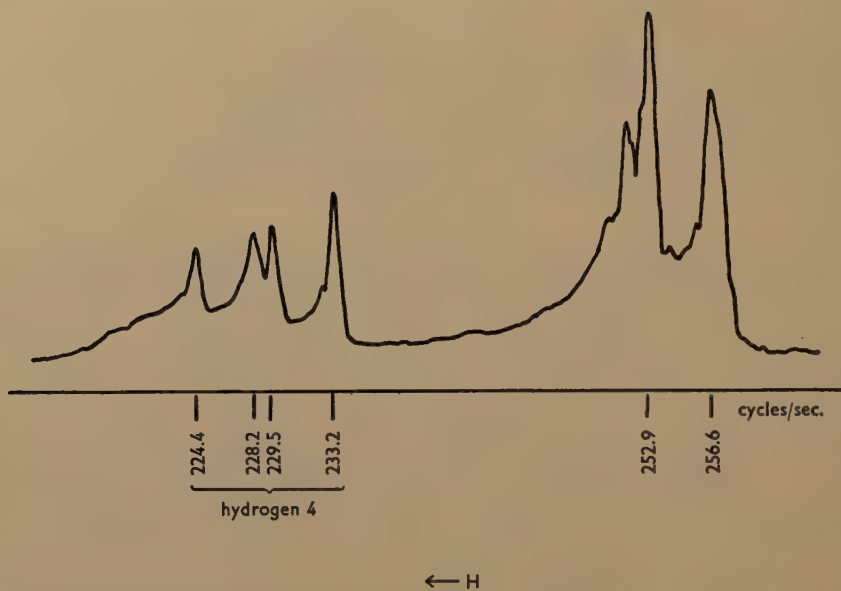


Fig. 6. NMR-spectrum of ring protons of 2-thiophenecarboxaldehyde at 40 Mc/s.

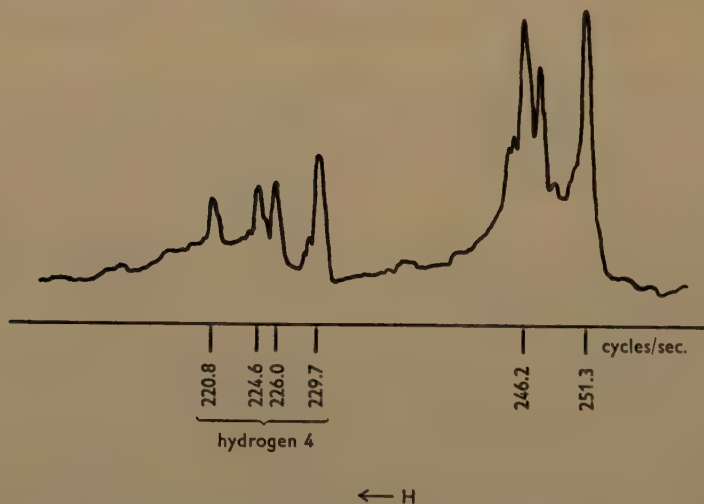


Fig. 7. NMR-spectrum of ring protons of 2-acetothienone at 40 Mc/s.

resonance occurs at somewhat lower field ($\delta = -0.60$ p.p.m.). The effect of both the inductive and conjugative effect is small in position 4, and accordingly the proton resonance is only slightly displaced ($\delta = -0.12$ p.p.m.). The NMR data, however, show clearly that the tautomeric effect of the methoxyl group to a large extent is a permanent electron displacement (mesomeric effect) and not solely an electromeric

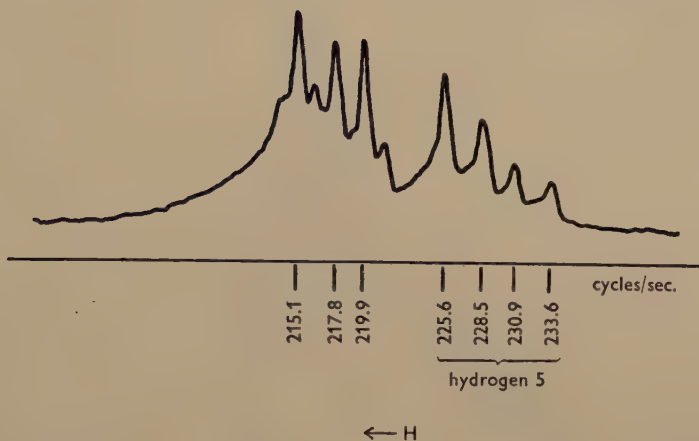


Fig. 8. NMR-spectrum of ring protons of methyl 3-thienyl sulphide at 40 Mc/s.

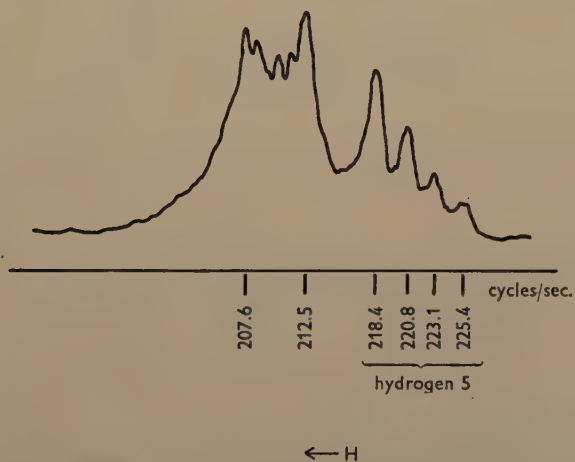


Fig. 9. NMR-spectrum of ring protons of 3-methylthiophene at 40 Mc/s.

effect (polarizability effect). The permanent nature of mesomerism has also been demonstrated by the difference in dipole moment between dimethyl ether (1.31 D) and anisole (1.16 D) (15).

The mesomeric influence will of course vary according to the system to which it is attached, being called into play to a greater or less extent as the system is more or less capable of conjugation and consequent resonance stabilization. The above mentioned results give evidence for greater conjugation in the thiophene compounds than in the benzene analog anisole, as Corio and Dailey obtained no internal resolved shifts for this compound ($\delta = -0.23$ p.p.m.).

For the sulphur analog, methyl 2-thienyl sulphide, only minor internal shifts were observed and this gives additional evidence that the tautomeric effect of the

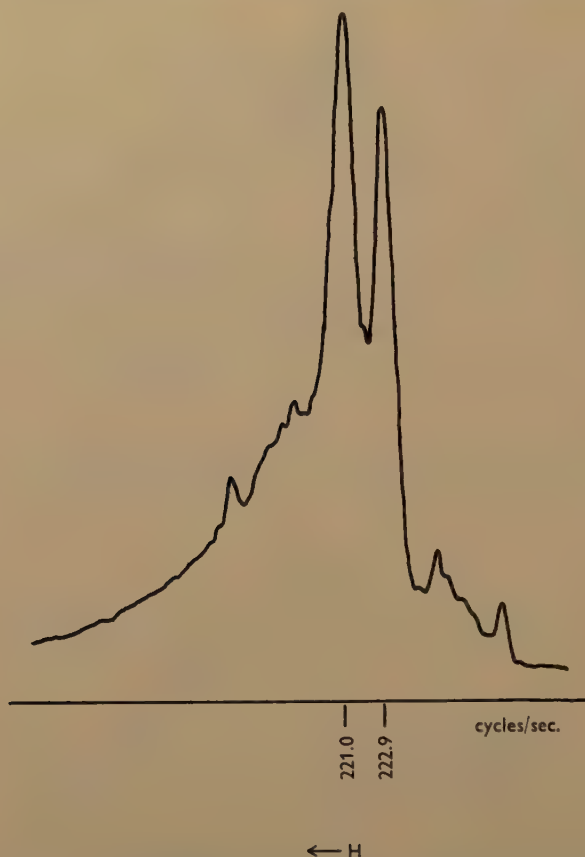
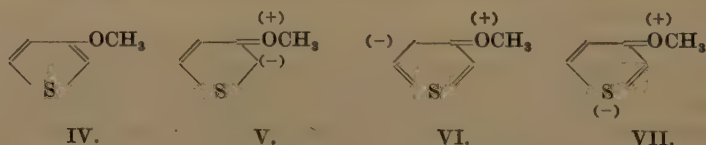


Fig. 10. NMR-spectrum of ring protons of thiophene at 40 Mc/s.

$-\text{SCH}_3$ group, which activates the ortho and the para positions towards electrophilic substitution, is largely electromeric in nature, being a polarizability effect which comes into play on demand of the reagent.

If we now turn to the 3-isomer, 3-methoxythiophene, several interesting features appear. One of us (14) has earlier discussed the structure of 3-methoxythiophene and pointed out, after a discussion of the different resonance structures



that structures like VI and VII are of small importance compared with V and IV, as they have decets around the sulphur as well as $\text{C}=\text{S}$ double bonds. In other terms the mesomeric effect affects only position 2 but not 4. This is completely verified by

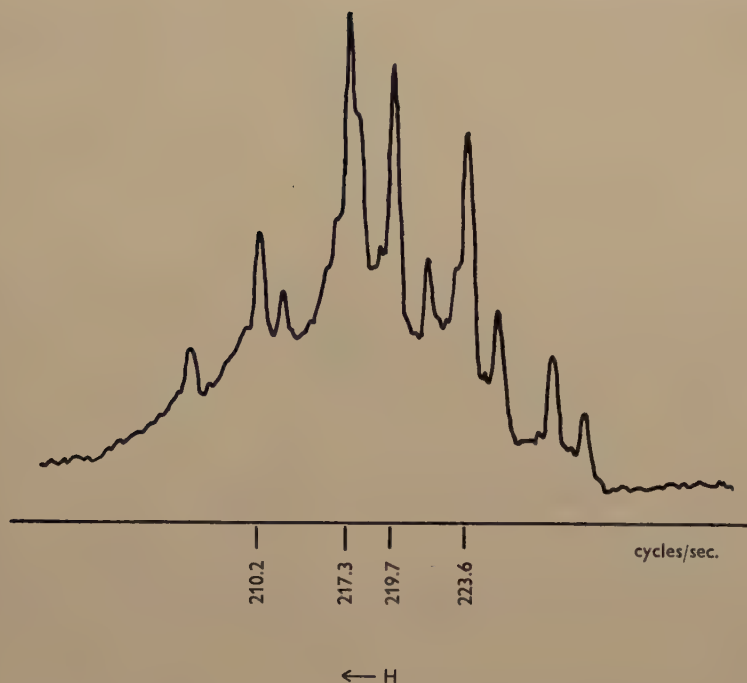


Fig. 11. NMR-spectrum of ring protons of methyl 2-thienyl sulphide at 40 Mc/s.

the NMR-spectrum of these compounds. The shift for hydrogen 2 (the "real" ortho position) is $\delta = -1.13$ p.p.m., that of position 4 only $\delta = -0.05$ p.p.m. and that of position 5 $\delta = -0.25$ p.p.m. The shift for the 2-hydrogen is thus so large that although in thiophene the α -resonance appears at the lowest applied field it is shifted to higher field than hydrogen 4.

The effect of a $-I-M$ -substituent such as $-\text{NO}_2$ is especially interesting and offers several problems. Corio and Dailey (7) found that the chemical shift in nitrobenzene is largest for the ortho hydrogens but of the same order for meta and para hydrogens, indicating that the relative electron-density is lowest at the ortho position and of the same order in the meta position and para position.

A probable explanation of this is that, as is usually assumed, the inductive effect of these types of substituents is most important and although this effect is relayed to the para position through the π -electron cloud, it is strongest in the ortho position partly due to the associated direct effect of the positive pole on the nitrogen. However, chemical data show that the main by-products in electrophilic substitution of compounds containing $-I-M$ substituents are the ortho isomers (16). The explanation given by Corio and Dailey that the difference between the NMR-data and chemical reactivity in these cases are due to some degree of polarization during the course of reaction seems somewhat improbable, as the electromeric electron-withdrawing effect of the substituent cannot be called into play by a reagent seeking high electron-density. The NMR-data do not support Ingold's (17) interpretation that the $-M$ effect selectively deactivates the para position and places a larger positive

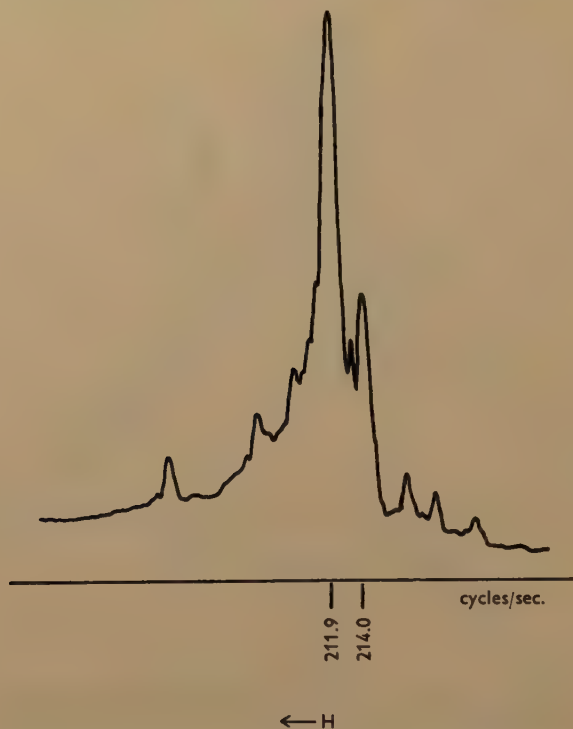
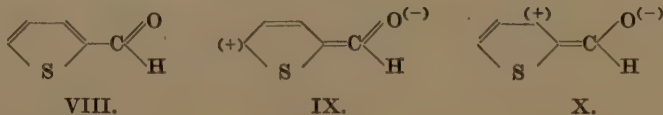


Fig. 12 NMR-spectrum of ring protons of 2-chlorothiophene at 40 Mc/s.

charge on the para position than the ortho position. It might thus be possible that the alternative explanation of the ortho substitution given by Lapworth and Robinson (18) is more correct. They suggested a special facilitation of ortho substitution depending upon a cyclic mechanism; the multiple bond in the side-chain adds the reagent and passes it internally to an ortho position.

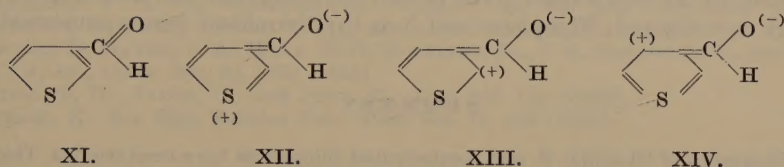
If we now turn to thiophene compounds with $-I -M$ substituents, it is apparent from the following resonance structures:



that the combined $-I -M$ effect makes position 3 and 5, corresponding to ortho and para in benzene, more positive. As in nitrobenzene the shifts for the 4 (meta) and 5 (para) hydrogens are of the same order.

For the 3-substituted compounds one of us (19) has earlier pointed out that a $-I -M$ substituent in position 3 should not selectively deactivate position 4 by its mesomeric effect, which is evident from the following resonance structures:

assuming again that structures like XII and XIV contribute with small mixing coefficients and thus are of little importance. This is also in accordance with molecular



orbital calculations by Melander (20). This effect is also evident in methyl 3-thienyl sulphone where the chemical shift for hydrogen 2 is $\delta = +0.98$ p.p.m. versus $\delta = +0.73$ p.p.m. for hydrogen 4. The same order of the hydrogens is obtained in 3-acetothienone although the difference is somewhat smaller. In the last case the resolution of the spectrum for the 4- and 5-hydrogens is low, so some doubt exists about the correctness of the assignments. It is hoped that an investigation of the NMR spectrum of 3-nitrothiophene will clarify the situation.

A complete discussion of those compounds for which complete resolution has not been obtained is impossible. However, certain trends may be pointed out. In all 2-substituted thiophenes containing $-I$ $-M$ substituents, hydrogen 4 is shifted from the other hydrogens, and resonance occurs at higher applied field. In the corresponding 3-isomers it is hydrogen 2 which is most shifted and its resonance occurs at lower applied field. In 3-substituted thiophenes containing $+M$, or $+I$ substituents, hydrogen 5 is separated from the others and its resonance occurs at lower field.

Experimental

The spectra were obtained with a Varian Associates Model V-4300B High-Resolution Spectrometer and a flux-stabilized 12" magnet model V-4012-HR from the same company. The magnet sweep was calibrated by the modulation side-band technique (10) and the shifts from the internal standard were obtained by interpolation on the recorder chart. The modulation frequency was 50 c/s obtained from the power line.

Most of the compounds investigated have simultaneously been used for a study of their UV-spectra (21) and they were therefore of highest purity, although interference from small amounts of impurities, if they are not paramagnetic, is negligible in NMR-studies of protons.

Compounds	B.p./M.p.	Ref.
Thiophene	84°	
3-Methylthiophene	115–116°	
2-Methylthiophene	112–113°	22
2-Chlorothiophene	128–129°	23
2-Iodothiophene	70–71° (13 mm)	24
2-Nitrothiophene	44–45° (m.p.)	25
2-Acetothienone	93–94° (12 mm)	26
2,5-Dibromothiophene	84–85° (12 mm)	27
3,4-Dibromothiophene	97–98° (12 mm)	28

The properties and methods of preparation of these compounds are given in reference (21).

In addition to the compounds given in this reference, the thiophenes in the table above were investigated. Thiophene and 3-methylthiophene were commercial products.

SUMMARY

The NMR-spectra of 20 simple 2- and 3-substituted thiophenes have been studied. Thiophenes containing strongly polar groups as $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_2\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$ and $-\text{COCH}_3$ gave well resolved spectra. The four spin-spin coupling constants J_{23} , J_{24} , J_{25} and J_{34} are clearly different making the identification of the protons giving rise to any one of the groups of lines possible. The J values obtained are $J_{23} = 5.4 \pm 0.6$ c/s; $J_{34} = 3.8 \pm 0.3$ c/s; $J_{25} = 2.7 \pm 0.4$ c/s; $J_{35} = 1.6 \pm 0.3$ c/s.

The connection between the structure of thiophenes and the chemical shifts have been discussed. The shifts give evidence of the special effect of a substituent in position 3 on the 4-position.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their thanks to Professor Arne Fredga and to Professor Kai Siegbahn for their interest in this work. Thanks are also due to the head of the Institute of Organic Chemistry, Royal Agricultural College, Professor Nils Hellström, for all facilities put at the authors' disposal. One of us (R.A.H.) wants to thank the State Council of Technical Research (of Sweden) for a grant.

Institute of Organic Chemistry, Royal Agricultural College, Uppsala and Institute of Physics, University of Uppsala, August 1958.

REFERENCES

1. RAMSEY, N. F., *Phys. Rev.* **78**, 699 (1950).
2. GUTOWSKY, H. S., and HOFFMAN, C. J., *J. Chem. Phys.* **19**, 1259 (1951).
3. GUTOWSKY, H. S., McCALL, D. W., MCGARWEY, B. R., and MEYER, L. H., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 4809 (1952).
4. CORIO, P. L., and DAILEY, B. P., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3043 (1956).
5. BERNSTEIN, H. J., POPLER, J. A., and SCHNEIDER, W. G., *Can. J. Chem.* **35**, 65 (1957).
6. SCHNEIDER, W. G., BERNSTEIN, H. J., and POPLER, J. A., *Can. J. Chem.* **35**, 1487 (1957).
7. CORIO, P. L., and DAILEY, B. P., *J. Chem. Phys.* **25**, 1291 (1956).
8. BOTHNER-BY, A. A., and GLICK, R. E., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1071 (1956).
9. COREY, E. J., SLOMP, G., DEV, S., TOBINAGA, S., and GLAZIER, R. E., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1204 (1958).
10. ANDERSON, W. A., *Phys. Rev.* **102**, 151 (1956).
11. GUTOWSKY, H. S., HOLM, C. H., SAIKA, A., and WILLIAMS, G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4596 (1957).
12. GLICK, R. E., and BOTHNER-BY, A. A., *J. Chem. Phys.* **25**, 362 (1956).
13. HOFFMAN, R., and GRONOWITZ, S. To be published.
14. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* **8**, 239 (1955).
15. WILES, L. A., *Chem. Rev.* **56**, 329 (1956).
16. INGOLD, C. K., *Structure and mechanism in Organic Chemistry*. London 1953, p. 262.
17. INGOLD, C. K., *Ann. Repts. on Progress Chem.* **23**, 140 (1926).
18. LAPWORTH, A., and ROBINSON, R., *Mem. Proc. Manchester Lit. & Phil. Soc.* **72**, 43 (1928), cited in ref. 16.
19. GRONOWITZ, S., and ROSENBERG, A., *Arkiv Kemi* **8**, 23 (1955).
20. MELANDER, L., *Arkiv Kemi* **11**, 397 (1957).
21. GRONOWITZ, S., *Arkiv Kemi* **13**, 239 (1958).

22. KING, V. J., and NORD, F. F., *J. Org. Chem.* *14*, 638 (1949).
23. COONRADT, H. L., HARTOUGH, H. D., and JOHNSON, G. C., *J. Am. Chem. Soc.* *70*, 2564 (1948).
24. MINNIS, W., *Org. Syntheses Coll. Volume II*, p. 357, New York 1943.
25. BABASINIAN, V. S., *Org. Syntheses Coll. Volume II*, p. 466, New York 1943.
26. HARTOUGH, H. D. and KOSAK, A. I., *J. Am. Chem. Soc.* *69*, 3093 (1948).
27. MOZINGO, R., HARRIS, S. A., WOLF, D. E., HOFFHINE, JR., C. E., EASTON, N. R., and FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.* *67*, 2092 (1945).
28. STEINKOFF, W., JACOB, H., and PENZ, H., *Ann.* *512*, 136 (1934).
29. KIKUCHI, K., *Sci. Rep. Tohoku Univ. First Ser.* *15*, 133 (1956).

Tryckt den 24 oktober 1958

Uppsala 1958. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

